

**Einfluss von Hochdruck
auf die Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure
in einem Festbettreaktor**

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation (Monographie)

von
Jannis Alexander Reich

aus
Hamburg
Deutschland

2025

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese
Zweiter Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Michael Schlüter
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Mirko Skiborowski

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juni 2025

DOI <https://doi.org/10.15480/882.15250>
ORCID iD 0000-0002-6374-6630

Creative Commons Lizenzvertrag

Der Text steht, soweit nicht anders gekennzeichnet, unter der Creative-Commons-Lizenz Namensnennung 4.0 (CC BY 4.0). Das bedeutet, dass er vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden darf, auch kommerziell, sofern dabei stets der Urheber, die Quelle des Textes und o. g. Lizenz genannt werden. Die genaue Formulierung der Lizenz kann unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de> aufgerufen werden.

Danksagung

Am Ende einer solchen Arbeit steht immer eine ganze Reihe an Leuten, die beim Erarbeiten und Verfassen geholfen haben. Zuallererst möchte ich ausdrücklich meinem Doktorvater und ersten Gutachter Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese danken, welcher nicht nur in längeren Diskussionen immer eine verlässliche Hilfe, sondern auch ein Wegweiser war. Aber auch kürzere Fragen waren wieder und wieder für die Motivation gut.

Prof. Dr.-Ing. Mirko Skiborowski, welcher den Vorsitz des Prüfungsausschusses übernahm, und Prof. Dr.-Ing. Michael Schlüter, welcher das zweite Gutachten erstellte, sei für sehr anregende Diskussionen und ihre Zeit gedankt.

Dr. Paul Bubenheim hat als Gruppenleiter stets zu Diskussionen und Austausch angeregt, welches das A und Ω bei der Arbeit in der Wissenschaft ist.

Auch waren sämtliche Allianzpartner von protP.S.I. stets hilfsbereit und für Gespräche offen. Die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme wurden bei Galab Laboratories GmbH von Dr. Miriam Aßmann unter Dr. Jürgen Kuballa hergestellt. Herzlichen Dank für dieses beeindruckende Material und die Zusammenarbeit.

Bei allen Festangestellten und Kollegen des ITBs möchte ich mich für vieles bedanken: Die kooperative Arbeitsatmosphäre und jede Hilfestellungen bei technischen, analytischen oder organisatorischen Herausforderungen schätze ich sehr.

Meinem damaligen Bachelor-Student Christoph und auch den Auszubildenden Henry, Anna-Lena, Arda, Osman, Tim und Jana möchte ich sagen, dass jeder auf die eine oder andere Weise einen Fußabdruck in meiner Arbeit hinterlassen hat.

Es ist schön, wenn aus Kollegen Freunde werden. Und deshalb müssen hier auch Daniela, Frederic und Fernando genannt werden, da nicht nur Langeweile unterdrückt wurde, sondern auch viele Ideen aus anfänglich albernen Gesprächen entstanden.

Aber auch allen Angestellten der Universität, die hinter den Kulissen die Räder am Laufen halten, soll an dieser Stelle gedankt werden - den Hausmeistern, der Verwaltung und dem Reinigungspersonal.

Auch möchte ich hier allen anonymen Helfern danken, die mir das Arbeiten durch Open-Source-Programme deutlich erleichtert haben. Sei es durch öffentliche MATLAB[®]-Funktionen oder L^AT_EX-Pakete.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Frau und der gesamten Familie bedanken, welche mich zu jeder Zeit bedingungslos unterstützt haben. Viele Herausforderungen wurden so direkt im Keim unterdrückt. Auch den Kleinsten an dieser Stelle ein Danke, da ich ohne sie nicht wüsste, dass ein Tag wirklich 24 h haben kann.

Und somit zum Anfang der Arbeit →

Kurzfassung

Um zu der Entwicklung der Biotechnologie beizutragen wurden zwei Aspekte identifiziert, welche in dieser Arbeit adressiert wurden. Zum einen wird von verschiedenen Autoren großes Potential in kontinuierlich arbeitenden Reaktorkonzepten gesehen. Zum anderen bieten Hochdruck als neuer Prozessparameter Möglichkeiten zur Prozessintensivierung.

Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit zunächst ein Reaktorkonzept im Labormaßstab entwickelt, welches zum einen kontinuierlich arbeitet und zum anderen mittels Hochdruck (bis 130 MPa / 1300 bar) die Ausbeute einer Modellreaktion erhöht.

Als Modellsystem wurde die Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) ausgehend von *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) und Pyruvat (Pyr) gewählt. Es wurde der Einfluss von Hochdruck auf die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts und auf die Reaktionskinetik vermessen.

Der realisierte Reaktoraufbau basiert auf einem Festbettreaktor, Kapillaren mit 50 μm Innendurchmesser und einem Rückdruckregler (RDR). Im Gegensatz zu gängigen Hochdruck-Satzreaktoren bietet das entworfene Reaktorsystem die Vorteile, dass Druck und Konzentrationen während des Betriebs verändert und das Reaktionsmedium vermessen werden kann. Hierdurch kann der experimentelle Aufwand kinetischer Messungen deutlich reduziert werden.

Der entworfene Festbettreaktor konnte zu einem Umlaufreaktor modifiziert werden. Mit diesem können beliebige Reaktionszeiten erreicht und so das Reaktionsgleichgewicht vermessen werden. Gegenüber Satzreaktoren bietet er bedeutende Vorteile: Proben können direkt entnommen werden, während der Reaktor in Betrieb ist und hoher Druck vorliegt. Der Hochdruckumlaufreaktor kann mittels nicht für Hochdruck ausgelegte Pumpen modifiziert werden, wodurch ein kontinuierlicher Betrieb ermöglicht wird.

Mittels kinetischer Studien konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von Pyr zu beiden untersuchten Enzymen mit Druck erhöht wird.

Es konnte gezeigt werden, dass das thermodynamische Gleichgewicht der Aldol-Reaktion von *N*-Acetyl-D-mannosamin (ManNAc) und Pyr zu Neu5Ac durch Druck positiv beeinflusst wird. Die Gleichgewichtskonstante wurde von $(20,9 \pm 0,9)$ L/mol auf $(43,9 \pm 3,0)$ L/mol gesteigert. Damit wurde eine Änderung des molaren Volumens von $(-16,0 \pm 1,2)$ mL/mol berechnet.

Auch die Reaktionssequenz wurde positiv durch Druck beeinflusst. Hier konnte die Reaktionsausbeute um 14 % (von 47,5 % auf 54,1 %) gesteigert werden. Auch wurden sowohl der Umsatz, als auch die Reaktionsselektivität mittels Druck erhöht.

Unter Berücksichtigung thermodynamischer und wirtschaftlicher Größen wurde eine allgemeine Kosten-Nutzen-Analyse für Hochdruck durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stand der Technik	2
1.1.1	Modellsystem: Synthese von N-Acetylneuraminsäure	2
1.1.2	Verwendung von Hochdruck in der Biotechnologie	3
1.1.3	Kontinuierlich betriebene Reaktoren	5
1.2	Die Forschungsallianz protP.S.I.	6
2	Aufgabenstellung	7
3	Theorie	9
3.1	Reaktionskinetik	10
3.1.1	Enzymkinetik nach Michaelis-Menten	11
3.1.2	Kinetik der Epimerase	13
3.1.3	Kinetik der Aldolase	14
3.1.4	Immobilisierung von Enzymen auf einem Träger	15
3.1.5	Diffusionslimitierung	16
3.2	Thermodynamisches Gleichgewicht	17
3.2.1	Zusammenhang zu kinetischen Parametern - Haldane-Beziehung .	19
3.2.2	Gekoppelte Reaktionen	21
3.3	Festbettreaktor	21
3.3.1	Verweilzeitverteilung	23
3.3.2	Reynolds-Zahl	25
3.3.3	Bernoulli-Gleichung	26
3.4	Rührkessel / Umlaufreaktor	26
3.5	Druckeinfluss auf Reaktionen, Enzyme und andere physikalische Größen	27
3.5.1	Thermodynamisches Gleichgewicht	27
3.5.2	Kinetik	28
3.5.3	Einfluss auf den pH-Wert	29
3.5.4	Dichte und Viskosität	29
3.6	Druckverlust	31
3.6.1	Festbetten	31
3.6.2	Kapillaren	31
3.6.3	Rückdruckregler	31
4	Ergebnisse	33
4.1	Entwicklung des Hochdruckreaktors	33
4.1.1	Druckaufbau Variante 1: UHPLC-Säule	34

4.1.2	Druckaufbau Variante 2: Kapillaren	35
4.1.3	Druckaufbau Variante 3: Rückdruckregler	35
4.1.4	System der Wahl	36
4.2	Charakterisierung des Aufbaus	38
4.2.1	Druckschwankungen	38
4.2.2	Verweilzeitverteilung des Festbett-Reaktors	40
4.2.3	Totzeit des Aufbaus	42
4.2.4	Genauigkeit der Mischkammer	43
4.2.5	Umlaufreaktor: Mischzeit und Reaktionsvolumen	45
4.3	Grundlegende Untersuchungen zu den Reaktionen	48
4.3.1	Stabilität des Trägermaterials	48
4.3.2	Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit mittels des Festbette- reaktors	49
4.3.3	Diffusionslimitierung	50
4.3.4	Vermessung des Schmelzpunktes der Enzyme	51
4.4	Aldolase	53
4.4.1	Gleichgewicht	53
4.4.2	Kinetik	56
4.4.3	Zusammenfassung	63
4.5	Epimerase	64
4.5.1	Kinetik	64
4.5.2	Gleichgewicht	72
4.5.3	Zusammenfassung	74
4.6	Gekoppeltes System im Umlaufreaktor	75
4.6.1	Reaktionsfortschritt	76
4.6.2	Gleichgewicht	80
4.6.3	Zusammenfassung	82
4.7	Machbarkeitsnachweis: kontinuierlich betriebener Umlaufreaktor	83
5	Diskussion und Ausblick	87
5.1	Experimenteller Aufbau	87
5.2	Diskussion der Messergebnisse	88
5.2.1	Berücksichtigte Messwerte	89
5.2.2	Verwendung protonierter Neuraminsäure	89
5.3	Wirtschaftlichkeitsanalyse: Vorteile und Kosten von Hochdruck	90
5.3.1	Endkonzentration / Gleichgewicht	91
5.3.2	Kinetik	99
5.4	Ausblick	102
6	Zusammenfassung	105
A	Material und Methoden	107
A.1	Material	107

A.2	Methoden	110
A.2.1	Probennahme	111
A.2.2	Bestimmung der Reaktionsrate im Festbett	111
A.2.3	Variation von Konzentration mittels Mischkammer	111
A.2.4	Berechnung der kinetischen Parameter	112
A.2.5	Befüllen des Reaktors und Messung der Enzymmenge	112
A.2.6	Ansetzen der KP_i -Puffer-Lösung	113
A.2.7	UV-Detektor Knauer und Bestimmung der Verweilzeitverteilung des Aufbaus	113
A.2.8	Bestimmung der Verweilzeitverteilung des Reaktors mittels HPLC	114
A.2.9	Bestimmung der Mischzeit und Reaktionsvolumen des Umlaufreaktors	114
A.2.10	Numerische Berechnung kinetischer Parameter	115
A.2.11	Reaktionsmedium im Umlaufreaktor	118
A.2.12	Bewertung der Qualität von Regressionsfunktionen	118
A.2.13	Numerische Ableitung	118
A.2.14	Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels CamSizer	119
A.2.15	Kalibration und Auswertung der Raman-Spektren	119
A.2.16	Schmelzpunktbestimmung	120
A.3	HPLC Kalibration	121
A.3.1	Erstes HPLC System	123
A.3.2	Zweites HPLC System	124
A.4	Charakterisierung der Druckdaten	126
A.5	Matlab-Skripte	127
A.5.1	Kalibrationsgeraden	127
A.5.2	Exponentielle Regression	131
A.5.3	Michaelis-Menten-Regression	132
A.5.4	Numerische Ableitung (Verweilzeitverteilung)	134
A.5.5	Basislinienkorrektur	134
A.5.6	Simulation des Reaktionsfortschrittes	136
A.5.7	Berechnung optimales Enzym-Verhältnis	138
A.5.8	Berechnung des Umsatzes für den kontinuierlichen Umlaufreaktor	140
A.5.9	Höhenlinien von Gleichgewichtsumsatz und Gewinn	141
A.5.10	Wirtschaftlichkeitsanalyse mittels Gleichgewichtsumsatz	143
A.5.11	Import der Druckdaten	144
A.5.12	Reduzierung der Datendichte von einer Druckdatei	146
B	Zusätzliche Informationen	147
B.1	Kritische Reynolds-Zahlen	147
B.2	Weitere Abhängigkeiten der Gleichgewichtskonstanten	148
B.2.1	Selektivität von Folgereaktionen	148
C	Ergänzungen zu Formeln	151
C.1	Fehlerfortpflanzung nach DIN 1319-3	151
C.2	Massenbilanz im Strömungsrohr	152

C.3	Dirac-Puls und Heaviside-Stufenfunktion	153
C.4	Numerische Faltung zweier Funktionen	153
C.5	Viskosität in Abhängigkeit von Druck und Temperatur	153

Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
A	Anpassungsfaktor	-
A_c	Querschnittsfläche	m^2
a_i	Mischungsaktivität	-
a_{sp}	spezifische Aktivität	$(\mu)\text{mol/g/min}$
$a_{sp,max}$	max. spezifische Aktivität	$(\mu)\text{mol/g/min}$
B	Anpassungsparameter	$1/\text{Pa}$
b	y-Achsen-Abschnitt	variiert
b_K	Breite einer Klasse	variiert
b_p	Anpassungsparameter	$1/\text{Pa}$
C	Anpassungsparameter	$1/\text{Pa}^2$
C_2	Anpassungsparameter	$1/\text{Pa}$
\mathbf{c}	Vektor mit Konzentrationen	mol/m^3
\mathbf{c}_{aus}	Vektor mit austretenden Konzentrationen	mol/m^3
$c_{E,0}$	initiale Enzymkonzentration	mol/m^3
\hat{c}_E	Enzymkonzentration	kg/m^3
c_{EI}	Konzentration Enzym-Inhibitor-Komplex	mol/m^3
\mathbf{c}_{ein}	Vektor mit eintretenden Konzentrationen	mol/m^3
c_η	Korrekturfaktor f. Aldolase-Kinetik	-
c_i	Konzentration von i	mol/m^3
$c_{i,\infty}$	Konzentration von i nach unendlich Zeit	mol/m^3
c_I	InhibitorKonzentration	mol/m^3
\hat{c}_i	Massenkonzentration von i	kg/m^3
c_G	GlcNAc-Konzentration	mol/m^3
$c_{G,0}$	Initiale GlcNAc-Konzentration	mol/m^3
c_M	ManNAc-Konzentration	mol/m^3
$c_{M,0}$	Initiale ManNAc-Konzentration	mol/m^3
c_N	Neu5Ac-Konzentration	mol/m^3
c_P	Pyr-Konzentration	mol/m^3
$c_{P,0}$	Initiale Pyr-Konzentration	mol/m^3
c_P	Produktkonzentration	mol/m^3
c_S	Substratkonzentration	mol/m^3
$c_{S,0}$	Initiale Substratkonzentration	mol/m^3
$c_{S,\infty}$	Substratkonzentration im Medium	mol/m^3

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Symbol	Bedeutung	Einheit/Wert
D	Diffusionskoeffizient	m^2/s
d_1	Obere Grenze einer Partikelklasse	m
d_{Par}	Partikeldurchmesser	m
d_{Rea}	Reaktordurchmesser	m
E	Verweilzeitverteilung	1/min
e_1	Anpassungsparameter	-
e_2	Anpassungsparameter	-
e_P	Produktertrag	€/g
F	Verweilzeitsummenverteilung	-
F_n	normierter Fehler	variiert
f_x	Ableitung von f nach x	variiert
G	Gibbs-Energie	J/mol
H_s	Heaviside-Stufenfunktion	-
h	Höhe	m
h_m	Homogenitätsgrad	-
K	Gleichgewichtskonstante	-
K^\ddagger	Edukt-Übergangszustand-Gleichgewichtskonst.	-
K_0	Gleichgewichtskonst. bei ref. Druck	-
K_{Aldol}	Gleichgewichtskonst. der Aldol-Reaktion	m^3/mol
K_{Epi}	Gleichgewichtskonst. der Epimerisierung	-
K_a	Gleichgewichtskonst. mit Aktivität	-
K_c	Gleichgewichtskonst. mit Konzentration	variiert
K_f	Gleichgewichtskonst. mit Fugazität	-
K_γ	Gleichgewichtskonst. mit Aktivitätskoeff.	-
K_{ges}	Gleichgewichtskonstante der Reaktionssequenz	m^3/mol
K_I	Inhibitionskonstante	mol/m^3
K_I^M	Inhibitionskonst. durch ManNAc	mol/m^3
K_I^P	Inhibitionskonst. durch Pyr	mol/m^3
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	mol/m^3
$K_{M,P}$	Michaelis-Menten-Konst. Produkt	mol/m^3
$K_{M,S}$	Michaelis-Menten-Konst. Substrat	mol/m^3
K_M^G	Michaelis-Menten-Konst. f. GlcNAc	mol/m^3
K_M^M	Michaelis-Menten-Konst. f. ManNAc	mol/m^3
K_M^N	Michaelis-Menten-Konst. f. Neu5Ac	mol/m^3
K_M^P	Michaelis-Menten-Konst. f. Pyr	mol/m^3
K_V	Durchflusskoeffizient	m^3/s
K_v	Korrekturparameter	mol/m^3 o. m^3/mol

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Symbol	Bedeutung	Einheit/Wert
K_x	Gleichgewichtskonst. mit Molenbruch	-
k	Geschwindigkeitskonstante	variiert
k_1	Geschwindigkeitskonst.	$\text{m}^3/\text{mol/s}$
k_{-1}	Geschwindigkeitskonst.	1/s
k_2	Geschwindigkeitskonst.	1/s
k_{-2}	Geschwindigkeitskonst.	$\text{m}^3/\text{mol/s}$
k_3	Geschwindigkeitskonst.	$\text{m}^3/\text{mol/s}$
k_{-3}	Geschwindigkeitskonst.	1/s
k_{cat}	Geschwindigkeitskonst. f. Katalysator	1/s
k_E	spezifische Energiekosten	€/J
k_h	Geschwindigkeitskonst.	$\text{m}^3/\text{mol/s}$
k_r	Geschwindigkeitskonst.	$\text{m}^3/\text{mol/s}$
k_S	spezifische Substratkosten	€/g
k_{SP}	Spezifischer Parameter	$\text{m}^3/\text{mol/s}$
L	Länge	m
L_{Par}	charakteristische Länge v. Partikel	m
M_i	Molare Masse von i	kg/mol
M_P	Molare Masse v. Produkt	g/mol
M_S	Molare Masse v. Substrat	g/mol
\dot{m}	Massenstrom	kg/s
m_i	Masse von i	kg
\dot{m}_P	Massenstrom Produkt	kg/s
\dot{m}_S	Massenstrom Substrat	kg/s
N_K	Anzahl Klassen	-
N	Anzahl vorliegender Spezies	-
N_{mess}	Anzahl an Messwerten	-
n	Stoffmenge	mol
\dot{n}	Molenstrom	mol/s
n_P	Stoffmenge Produkt	mol
$n_{P,i}$	Stoffmenge Produkt i	mol
n_S	Stoffmenge Substrat	mol
P_P	Pumpleistung	W
\tilde{P}_P	massen-spezifische Pumpenergie	J/kg
p	Druck	Pa, N/m ²
pH	pH-Wert	-

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Symbol	Bedeutung	Einheit/Wert
Q	Summenverteilung	-
q	Größenverteilung	1/m
q_0	Anzahlverteilung	1/s
q_3	Massenverteilung	1/s
R_0	hydrodynamischer Radius v. Teilchen	m
Re	Reynolds-Zahl	-
r	Innerer Radius Kapillare	m
S	Selektivität	-
S_M	Messsignal	variiert
$S_{M,\infty}$	Messsignal nach unendlich langer Zeit	variiert
S_O	volumen-spezifische Oberfläche	1/m
s	Steigung einer Regressionsfunktion	variiert
T	Temperatur	K
t	Zeit	s
\bar{t}	Mittlere Verweilzeit	s
V	Volumen	m ³
\dot{V}	Volumenstrom	m ³ /s
V_{Fluid}	Volumen vom Fluid	m ³
V_G	Molares Volumen v. GlcNAc	m ³ /mol
V_M	Molares Volumen v. ManNAc	m ³ /mol
V_N	Molares Volumen v. Neu5Ac	m ³ /mol
V_P	Molares Volumen v. Pyr	m ³ /mol
V_{Kat}	Volumen vom Katalysator	m ³
V_{Rea}	Volumen vom Reaktor	m ³
v	Reaktionsgeschwindigkeit	mol/m ³ /s
v_{Aldol}	globale Reaktionsgeschwindigkeit d. Aldolase	mol/m ³ /s
v_{Epi}	globale Reaktionsgeschwindigkeit d. Epimerase	mol/m ³ /s
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	mol/m ³ /s
\overleftarrow{v}_{max}	max. Reaktionsgeschw. Rückreaktion	mol/m ³ /s
\overrightarrow{v}_{max}	max. Reaktionsgeschw. Hinreaktion	mol/m ³ /s
W	Wahrscheinlichkeit	-
w	Strömungsgeschwindigkeit	m/s
X	Umsatz	-
X_{GGW}	Gleichgewichtsumsatz	-
x	Strecke	m

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Symbol	Bedeutung	Einheit/Wert
x_i	Molenbruch	-
Y	Ausbeute	-
y_{mess}	Gemessene Größe	variiert
y_{reg}	Per Regression berechnete Größe	variiert
Griechische Symbole		
α	Initiales Verhältnis von Pyr zu ManNAc	-
γ_i	Aktivitätskoeffizient von i	-
Δc	Konzentrationsdifferenz	mol/m ³
Δp	Druckdifferenz	Pa
ΔV	Volumenänderung durch Reaktion	m ³ /mol
ΔV^\ddagger	Volumenänderung zw. Edukt u. Übergangszustand	m ³ /mol
$\Delta_R G$	Änderung Gibbsenergie wg. Reaktion	J/mol
Δx	Messunsicherheit von x	variiert
Δy	Messunsicherheit von y	variiert
Δz	Messunsicherheit von z	variiert
δ_i	Dichte von i	kg/m ³
$\Delta \dot{\epsilon}$	Differenz Geldfluss	€/s
$\Delta \epsilon$	Differenz Geld	€
$\dot{\epsilon}$	Geldfluss	€/s
$\dot{\epsilon}_{ein}$	Eintretender Geldfluss	€/s
$\dot{\epsilon}_{aus}$	Austretender Geldfluss	€/s
$\dot{\epsilon}_P$	Kosten für Druckerzeugung	€/s
ζ	Transmissionskoeffizient	-
η	dynamische Viskosität	Pa s
η_{RZA}	Raum-Zeit-Ausbeute	kg/m ³ /s
κ	Verhältnis Produkt(e) zu Substrat(e)	vairiert
κ_{E+A}	Verhältnis Neu5Ac zu GlcNAc und Pyr	m ³ /mol
λ	Wellenlänge	m
μ_1	erstes Moment einer Verweilung	variiert
μ_x	Mittelwert der Eingangsgröße	variiert
ν	kinematische Viskosität	m ² /s
ν_i	Stöchiometrischer Koeffizient von i	-
ν_f	Anteil Freiraumvolumen im Reaktor	-
ν_s	Anteil Feststoffvolumen im Reaktor	-
ξ_A	Anpassungskoeffizient f. Viskosität	1/Pa

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Symbol	Bedeutung	Einheit/Wert
ξ_B	Anpassungskoeffizient f. Viskosität	-
ξ_i	Stöchiometrischer Koeffizient von i	-
σ_x	Standardabweichung von x	variiert
τ	Verweilzeit	s
Φ	Thiele-Modul	-
Konstanten und Funktionen		
arctan	Arkustangens	-
π	Kreiszahl	3,141 5 ...
τ_o	Kreiszahl (alternativ)	6,283 1 ...
e	Eulers Konstante	2,718 2 ...
g	Gravitationsbeschleunigung	9,81 m/s ²
h	Planck-Konstante	6,626 0 ... · 10 ⁻³⁴ J s
k_B	Boltzmann-Konstante	1,381 ... J/K
ln	Logarithmus zur Basis e	-
R	Allgemeine Gaskonstante	8,314 4 ... J/mol/K

Abbildungsverzeichnis

1.1	1. Reaktionsschritt: Epimerisierung	3
1.2	2. Reaktionsschritt: Aldol-Reaktion	3
3.1	Reaktionsschema der Reaktionssequenz.	9
3.2	Substratkonzentration einer Reaktion über die Zeit.	10
3.3	Reaktionsschema nach Michaelis und Menten.	11
3.4	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (nach Michaelis-Menten).	12
3.5	Erweiterung des Reaktionsschema im Falle einer kompetitiven Inhibierung.	13
3.6	Unregelmäßige Schüttung eines Festbettes bestehend aus unterschiedlich großen Partikeln.	22
3.7	Konzentrationsverlauf über die Länge des Reaktors	23
3.8	Beispielhafte Verweilzeitverteilung	24
3.9	Darstellung verschiedener Geschwindigkeitsprofile in einem Rohr.	25
4.1	Fließbilder zur Untersuchung der Druckverluste verschiedener Bauteile	34
4.2	Druckverlust verschiedener Kapillaren bei verschiedenen Flussraten.	35
4.3	Festbettreaktor und Druckverlust über die Länge.	36
4.4	Drei Betriebsmodi des Hochdruckreaktors.	37
4.5	Verlauf des Drucks mit der Zeit.	39
4.6	Gemessene Verweilzeitverteilungen von dem HPLC-System und dem System mit eingebauten Reaktor	41
4.7	Durchströmung des Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC)-Systems.	43
4.8	Aufbau zur Vermessung der Pulsation der Mischkammer	43
4.9	Normiertes Signal der Mischkammer bei verschiedenen eingestellten Mischungen.	44
4.10	Untersuchung der Mischkammer: Fließbild des experimentellen Aufbaus.	44
4.11	Eingestellte und gemessene Konzentration der Mischkammer	45
4.12	Experimenteller Aufbau zur Bestimmung der Mischzeit im Umlaufreaktor.	46
4.13	Untersuchung der Mischzeit des Umlaufreaktors - wässrig	46
4.14	Untersuchung der Mischzeit des Umlaufreaktors - hochviskos	47
4.15	Partikelgrößenverteilung von neuen und druckbehandelten Trägern.	49
4.16	Umsatz der Epimerase bei verschiedenen Verweilzeiten.	50
4.17	Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit von unbehandelten und zerkleinerten Epimerase-Immobilisaten.	52
4.18	Aldolase: Gleichgewichtskonstante in Abhängigkeit vom Druck.	54

4.19	Aldolase: Verlauf des Gleichgewichtsumsatzes in Abhängigkeit vom Druck.	55
4.20	Kinetik der Hinreaktion der Aldolase	57
4.21	QQ-Diagramme mit und ohne die deklarierten Ausreißer.	58
4.22	Spezifische Aktivität der Aldolase in Abhängigkeit verschiedener ManNAc- oder Pyr-Konzentrationen.	60
4.23	Reaktionsrate der Rückreaktion der Aldolase mit Regressionskurve bei verschiedenen Drücken.	62
4.24	Reaktionsrate der Hinreaktion der Epimerase bei verschiedenen Drücken.	65
4.25	Inhibierung der Epimerase durch Pyr bei drei verschiedenen Druckstufen.	67
4.26	Inhibierung der Epimerase durch Pyr bei variablen Druck.	68
4.27	Berechnete Inhibierungskonstante von Pyr der Epimerase in Abhängigkeit vom Druck.	69
4.28	Reaktionsrate der Rückreaktion der Epimerase bei verschiedenen Drücken.	71
4.29	Epimerase: Gleichgewichtskonstante in Abhängigkeit vom Druck.	73
4.30	Reaktionsfortschritt und Lage des Gleichgewichts bei Verwendung von freier Epimerase	74
4.31	Konzentrationsverlauf von Neu5Ac bei gekoppelter Reaktion und Niedrigdruck	77
4.32	Konzentrationsverlauf von Neu5Ac der gekoppelten Reaktion bei Hochdruck.	78
4.33	Konzentrationsverlauf von Neu5Ac der gekoppelten Reaktion bei Niedrigdruck und Hochdruck.	78
4.34	Langzeitversuch der gekoppelten Reaktion mit Druckänderungen nach Erreichen des Gleichgewichts.	79
4.35	Erhaltene Werte für die Gleichgewichtskonstante der Aldol-Reaktion, Epimerisierung und Gesamtreaktion	81
4.36	Kontinuierlich arbeitender Umlaufreaktor	83
4.37	Kontinuierlich betriebener Umlaufreaktor - Umsatz unter Hochdruck bei verschiedenen Verweilzeiten.	86
5.1	Gleichgewichtsumsatz in Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten einer 2-zu-1-Reaktion.	91
5.2	Gleichgewichtsumsatz in Abhängigkeit von dem Druck bei verschiedenen thermodynamischen Parametern.	92
5.3	Geld-Bilanz um die UHPLC-Pumpe und den Reaktor	93
5.4	Monetärer Gewinn bei verschiedenen Werten für die Lage des Gleichgewichts und den Preis des Produktes.	94
5.5	Monetären Gewinns in Abhängigkeit vom Druck bei hochpreisigem Produkt.	95
5.6	Höhenlinien von Gleichgewichtsumsatz, absolutem und relativen monetären Gewinn in Abhängigkeit vom Substratverhältnis und vom Druck.	97
5.7	Differenz der Gleichgewichtsumsätze zwischen Hoch- und Niedrigdruck. .	98
5.8	Simulation des monetären Gewinns bei einem Satzreaktor für verschiedene Produktpreise und Drücke.	100

5.9	Simulierter Verlauf der Neu5Ac-Konzentration in einem Satzreaktor bei Niedrig- und Hochdruck.	100
5.10	Berechnete Zeit, ab welcher die Produktkonzentration eines Hochdruck- Versuchs die eines Niederdruckversuchs übersteigt.	101
5.11	Mittels Raman-Spektroskopie gemessene GlcNAc-Konzentration.	103
A.1	Korrelation zwischen Signal und KP_i -Puffekonzentration des UV-Detektor (UVD). Als Referenz wurde hochreines Wasser verwendet. Variiert wurde die KP_i -Pufferkonzentration bei 40 °C, Wellenlänge 200 nm.	114
A.2	Startwerte für beide Parameter (K_M und v_{max}), welche zeitgleich variiert wurden.	116
A.3	Numerische Berechnung der kinetischen Parameter bei verschiedenen Start- werten und Größenordnungen von der spezifischen Aktivität.	116
A.4	Experimenteller Aufbau zur Machbarkeitsstudie zur Raman-Sonde	119
A.5	Raman Spektren der GlcNAc- und ManNAc-Kalibration	120
A.6	Beispielhaftes Adsorptions-Temperatur-Profil. Epimerasen-Konzentration 10 mg/mL, 1 mM Adenosin triphosphat (ATP) und $MgCl_2$	121
A.7	Chromatogramm einer Probe, welche sämtliche Komponenten enthielt. .	122
A.8	Kalibration der ersten HPLC	124
A.9	Kalibration der zweiten HPLC	125
A.10	Verarbeitung der aufgezeichneten Druckdaten	127
B.1	Bestimmte Gleichgewichtskonstante der Epimerase bei niedrigen Konzen- trationen und verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen.	149
B.2	Verwendete Reaktionssequenz	149
C.1	Ein beliebig-kleines Volumenelement in einem Rohrreaktor (vergleiche Abbildung 3.6)	153

Tabellenverzeichnis

3.1	Dichte von Wasser	30
4.1	Vermessene Schmelzpunkte der freien Enzyme ohne und mit Druckbehandlung.	52
4.2	Kinetische Parameter der Hinreaktion der Aldolase nach verschiedenen Modellen.	58
4.3	Kinetische Parameter der Rückreaktion der Aldolase. Reaktionsbedingungen in Abbildung 4.23.	62
4.4	Kinetische Parameter der Hinreaktion der Epimerase bei verschiedenen Drücken.	65
4.5	Inhibierungskonstanten von Pyr für die Epimerase	67
4.6	Kinetische Parameter der Epimerase Rückreaktion.	71
4.7	Gleichgewichtsdaten der gekoppelten Reaktion: Umsatz, Selektivität und Ausbeute bei verschiedenen Drücken.	80
4.8	Berechnete thermodynamische Größen aus der gekoppelten Reaktion . . .	81
4.9	Raum-Zeit-Ausbeute, gemessener und berechneter Umsatz für den kontinuierlich arbeitenden Umlaufreaktor	84
A.1	Verwendete Chemikalien	108
A.2	Hochdruckaufbau. Von VICI verkaufte Produkte wurden durch MACHEREY-NAGEL vertrieben.	108
A.3	Verbrauchsmaterial	109
A.4	Software	109
A.5	Sonstige Messgeräte	109
A.6	Molare Massen der eingesetzten Chemikalien	110
A.7	Integrations- und Peakerkennungsparameter der HPLC	122
A.8	HPLC Systeme von Agilent Technologies, Inc. (In der quarternären Pumpe G7111B ist ein Degaser verbaut.)	123
A.9	Statistiken zu Abbildung A.8 und typische Retentionszeiten der verschiedenen Komponenten.	123
A.10	Statistiken zu Abbildung A.9 und typische Retentionszeiten der verschiedenen Komponenten.	125
B.1	Berechnete Reynolds-Zahlen. Gerechnet mit 2 mL/min, 1 000 kg/m ³ und 1 mPas.	147
C.1	Werte für die dynamische Viskosität von Wasser [90]	154

1 Einleitung

Biotechnologie ist unter anderem die Herstellung industriell interessanter Produkte mittels biologischen Systemen in technischer Umgebung. Diese Disziplin ist längst nicht mehr in den Kinderschuhen und es werden (je nach Produkt) Reaktordvolumen von 1 L bis über 100 000 L angewendet [1]. In einer Sammlung umgesetzter Prozesse stellten Satzreaktoren mit 75 % die deutliche Mehrheit dar [1]. Dies sind Reaktoren, bei welchem das hergestellte Produkt erst nach einer Zeit entnommen wird. Die restlichen 25 % stellten kontinuierliche Reaktoren wie Strömungsrohre, Membranreaktoren oder kontinuierlich arbeitende Satzreaktoren dar. Hier wird das hergestellte Produkt durchgehend entnommen. Um die Biotechnologie weiter voranzutreiben, sah Woodley einen essentiellen Aspekt darin, dass kontinuierlich betriebene Reaktortypen verwendet werden [2]. Auch Burek und Mitarbeiter schrieben, dass häufig Satzreaktoren zum Einsatz kämen, welche durch kontinuierliche Systeme verbessert würden [3]. Burek und Mitarbeiter stellten weiter fest, dass neue Reaktorkonzepte benötigt werden, um die Produktivität aktueller Prozesse zu erhöhen [3].

Ein solches neues Reaktorkonzept könnte die Verwendung von Drücken über 100 MPa (1 000 bar) sein, da laut Chataigner und Maddaluno Druck in dieser Größenordnung selbst in der älteren, chemischen Industrie noch nicht vollständig beachtet würde [4]. Auch in der Biotechnologie wurde dieses Potential noch nicht entfaltet [5]. Dass Druck die Reaktionsgeschwindigkeit von reinen Flüssigphasenreaktionen beeinflusst, ist bereits seit 1892 für die Inversion von Zucker bekannt [6]. Für Reaktionsgleichgewichte (unabhängig, ob es chemische oder enzymatische Reaktionen sind) kann mittels des Prinzips von Le Chatelier der Einfluss von Parametern auf das Gleichgewicht beschrieben werden [7]. Wenn mit der Reaktion das molare Volumen der Reaktanten abnimmt, führt die Anwendung von Druck dazu, dass die Konzentration des Produkts im Gleichgewicht erhöht ist. Für Gasphasenreaktionen ist dies hinreichend bekannt [8]. Bei Flüssigphasenreaktionen kann der Einfluss von Druck vernachlässigt werden, sofern kein Hochdruck verwendet wird [9].

Da Wasser die Basis des Lebens ist, finden enzymatische Reaktionen in Flüssigphasen statt. Um das Potential von Druck zu untersuchen, wurde die (flüssigphasige) Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) aus *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) und Pyruvat (Pyr) gewählt (2-zu-1-Reaktion), da hier eine Abnahme des molaren Volumens vermutet wird.

Im Folgenden wird der Stand der Technik vertieft und in drei Aspekten aufgeteilt: Die Synthese von Neu5Ac, die Verwendung von Hochdruck sowie die Verwendung von kontinuierlich arbeitenden Reaktoren.

1.1 Stand der Technik

Für die Beschreibung des Stands der Technik werden die drei Aspekte zunächst einzeln betrachtet.

Die mathematische Beschreibung der hier angeführten Druckeffekte ist in Kapitel 3 zu finden.

1.1.1 Modellsystem: Synthese von N-Acetylneuraminsäure

Neu5Ac ist die am meisten vertretene Komponente der Sialinsäuren [10–12]. Neu5Ac ist in der Zellmembran lokalisiert, welche durch diese Position mit interzellulären Signalen in Verbindung gebracht wurde [10, 13, 14]. Anfänglich wurden Neu5Ac bei der Signalübertragung in Nerven [15] und später auch im Hinblick auf Krebs untersucht [16, 17]. Auch Einflüsse auf das Immunsystem konnten festgestellt werden. Zum Beispiel binden Influenza Viren an der endkettigen Rezeptor-Neu5Ac der Zellmembran [18]. Neu5Ac tritt in menschlichen Zellen auf, wodurch nur bestimmte Rotaviren direkt in menschliche Zellen gelangen [19]. Es wurden Studien durchgeführt, welche nach möglichen Inhibierungen suchen, um die Bindung der viralen Proteine an Neu5Ac zu hemmen. Als prominentes Beispiel seien hier Veröffentlichungen zu den Wechselwirkungen zwischen dem Coronavirus (COVID-19) und Neu5Ac angeführt [20, 21]. Einige Autoren untersuchten ebenfalls die Möglichkeit der Integration von Neu5Ac in Corona-Schnelltests [22]. Neu5Ac kann weiter als Ausgangsstoff für komplexere Komponenten dienen [10, 23–26]. So ist Neu5Ac essentiell für die Entwicklung von Kleinkindern [27] und wird auch in Medikamenten verwendet [28, 29]. Durch die Wichtigkeit im Hormon- und Immunsystem stieg der weltweite Bedarf [25]. Als Lebensmittelzusatz wurde Neu5Ac 2016 in den Vereinigten Staaten von Amerika und 2017 in der Europäischen Union sowie der Volksrepublik China zugelassen [30].

Einige Forschergruppen verwendeten Ganzzellkatalyse [31–34], wobei Tao und Mitarbeiter in einer Zusammenfassung schrieben, dass dieser Ansatz häufig durch Stofftransport limitiert wäre und deshalb die enzymatische Herstellung produktiver sei [13]. Dennoch führt auch der Ansatz mittels Ganzzellkatalyse zu Patenten [35–37].

Xu und Mitarbeiter verwendeten einen weiteren Ansatz, indem eine Neu5Ac-Lyase auf *Bacillus subtilis* Sporen immobilisiert wurde [38].

Die enzymatische Herstellung von Neu5Ac wurde bereits 1960 untersucht [39]. Seitdem wurden immer wieder Forschungsarbeiten durchgeführt, um diese Komponente herzustellen, die beteiligten Enzyme zu analysieren [40] oder den Mechanismus zu untersuchen [23]. Die enzymatische Synthese verläuft meist über zwei Reaktionsschritte (Abbildung 1.1 und Abbildung 1.2) und wurde ausführlich untersucht [41–45]. Für das Enzym der ersten Reaktion (Epimerisierung) wurden verschiedene Namen verwendet: Epimerase, N-Acetylglucosamin 2-epimerase und AGE. In dieser Arbeit wird Epimerase als Name verwendet werden. Für das Enzym der zweiten Reaktion (Aldolreaktion) wurden ebenfalls unterschiedliche Bezeichnungen verwendet: Aldolase, NANase, Neu5Ac-Lyase, Neuraminidase und NAL. In dieser Arbeit wird der Name Aldolase verwendet.

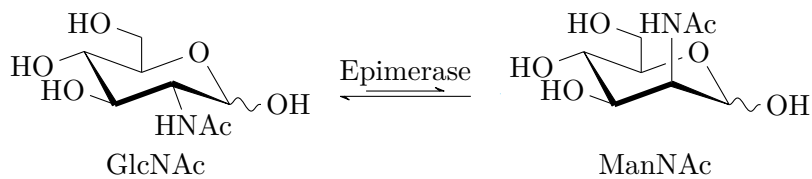


Abbildung 1.1: Eine Epimerase katalysiert den ersten Reaktionsschritt.

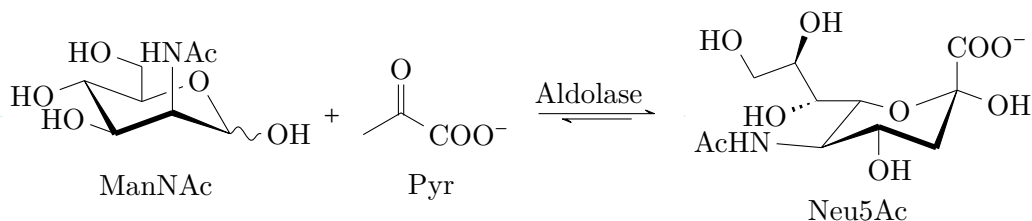


Abbildung 1.2: Eine Aldolase katalysiert den zweiten Reaktionsschritt.

Einige Gruppen verwenden eine immobilisierte Epimerase und Aldolase [24, 46, 47], um die Enzyme in Festbettreaktoren einzusetzen [48].

Viele gefundene Epimerasen sind durch Pyr, welches ein Substrat der Aldolase ist, inhibiert. Dies reduziert die Reaktionsgeschwindigkeit und stellt eine Limitation dar. Aus diesem Grund forschen verschiedene Gruppen an Epimerasen, welche weniger stark durch Pyr inhibiert werden [49, 50]. Eine weitere Limitierung ist die Lage des Reaktionsgleichgewichts der ersten Reaktion, da dieses weit auf der Seite von GlcNAc liegt [50]. In der Literatur werden für diese Reaktionssequenz deshalb zwei Lösungsansätze vorgeschlagen: Die Erhöhung von Eduktkonzentrationen [51] oder eine Erhöhung des Substratverhältnisses [52]. Da die Epimerase durch Pyr inhibiert wird, wirken sich beide Strategien negativ auf die Reaktionsrate aus.

Ein weiterer Ansatz wurde untersucht, bei welchem weitere Reaktionen hinzuzufügen wurden [53, 54].

Aufgrund des Prinzips von Le Chatelier, welches Eingangs erwähnt wurde, wird die Verwendung von Hochdruck als weiterer Lösungsansatz vermutet, da es sich bei der zweiten Reaktion um eine 2-zu-1-Reaktion handelt. Makroskopisch betrachtet stellt auch die gesamte Reaktionssequenz eine 2-zu-1-Reaktion dar.

Abschnitt 1.1.2 beinhaltet unter anderem Ergebnisse von Arbeitsgruppen zur Verschiebung von Reaktionsgleichgewichten mittels Druck.

1.1.2 Verwendung von Hochdruck in der Biotechnologie

In der Literatur werden verschiedene Begriffe zur Beschreibung von Druck um 100 MPa (dies entspricht 1000 bar - dem Wasserdruck in ca. 10 000 m Tiefe) benutzt. Einige Autoren nennen dies „Hochdruck“ (High-Pressure), andere „Ultrahochdruck“ (Ultra High-Pressure). Besonders in Hinblick auf die Lebensmitteltechnologie ist Hochdruck relativ, da hier teilweise Drücke im GPa-Bereich verwendet werden [55]. So beschreiben einige Autoren Drücke bis 700 MPa als Hochdruck und ab 700 MPa als Ultra-Hochdruck [55].

1 Einleitung

Letztere Beschreibung wird verwendet, um sich von wieder anderen Autoren abzugrenzen, welche „Hochdruck“ für Drücke um 1 MPa verwenden [56]. Aber auch in der Biotechnologie werden Werte bis 2 GPa als Hochdruck bezeichnet [4]. Im Rahmen dieser Arbeit wird „Hochdruck“ verwendet werden, um Drücke um 100 MPa zu beschreiben. Drücke bis 10 MPa werden dabei als Niedrigdruck beschrieben (nicht zu verwechseln mit Unterdruck).

Gängig und etabliert ist die Verwendung von mehreren hundert MPa in der Lebensmittelindustrie. Hierbei wird der Druck eingesetzt, um unerwünschte Enzyme oder Bakterien in Lebensmitteln zu deaktivieren oder abzutöten [57–59]. Diese Technologie ist kommerziell im Einsatz [60], wodurch großes Interesse an der Forschung besteht, was sich wiederum in der Anzahl der Veröffentlichungen verdeutlicht [61, 62]

Autoren, welche Druck verwenden, um Reaktionsraten zu erhöhen anstelle zu senken, räumen ein, dass der Großteil von Hochdruckanwendungen für die Deaktivierung eingesetzt wird [5]. Hinzu kommt, dass auch in der Lebensmittelverfahrenstechnik Druckanwendungen erforscht werden, welche Reaktionen beschleunigen, um zum Beispiel Reifungsprozesse [63] oder die Produktion des Geschmacksverstärkers Inosinmonophosphat zu beschleunigen [64].

Auch, wenn die deaktivierende Wirkung von Druck prominenter ist, weist Hochdruck mehrere „konstruktive“ Aspekte auf, welche Enzyme stabilisieren, Reaktionen beschleunigen oder Gleichgewichte verschieben.

Bereits 1892 hatte Röntgen festgestellt, dass Druck chemische Reaktionen beschleunigen kann [6]. Nur wenige Jahrzehnte später zeigte Eyring, dass auch die Reaktionsrate von enzymatisch-katalysierten Reaktionen abhängig vom Druck ist [65]. Mittels der Theorie zum Übergangszustand leitete Eyring einen Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und Druck her [66], welcher auch in aktueller Literatur unter *Eyring-Gleichung* bekannt ist [67, 68] und angewandt wird [69–71]. Die Eyring-Gleichung wurde auch verwendet, um die Abhängigkeit von mehreren Reaktionsschritten einer enzymatischen Reaktion vom Druck abzubilden [72].

$$RT \left(\frac{\partial \ln(k)}{\partial p} \right)_T = -\Delta V^\ddagger \quad (1.1)$$

Hierbei ist R die ideale Gaskonstante (8,3144... J/mol/K), T die Temperatur (in K), k die Geschwindigkeitskonstante (variable Einheit), p der Druck (in Pa) und ΔV^\ddagger das Aktivierungsvolumen (in m³/mol). Das Aktivierungsvolumen stellt den Unterschied im molaren Volumen zwischen Substrat und Übergangszustand dar. Während ΔV^\ddagger in Gleichung (1.1) als konstant angenommen wird, gibt es auch Berichte, dass es vom Druck abhängt [68, 72] und Autoren passen Gleichung (1.1) entsprechend an [73]. Ist das molare Volumen des Übergangszustandes geringer als das des Substrates, wird die Geschwindigkeitskonstante (und damit die Reaktionsrate) durch Druck exponentiell erhöht. Es wurden auch Enzyme gefunden, bei welchen die Reaktionsrate mit Druck sinkt [74] oder die Aktivität der Enzyme bis zu einem kritischen Druck unbeeinflusst ist und dann abnimmt [75].

Der Eyring-Gleichung liegt die Annahme zugrunde, dass sich Substrat und Übergangszustand im Reaktionsgleichgewicht befinden. Die Beschreibung zur Abhängigkeit zwischen

Reaktionsgleichgewicht und Druck wurde bereits in 1887 formuliert [76] und bildet die mathematische Beschreibung des Prinzips von Le Chatelier [7].

$$RT \left(\frac{\partial \ln(K)}{\partial p} \right)_T = -\Delta V \quad (1.2)$$

Mit K als Gleichgewichtskonstante (dimensionslos) und ΔV als Änderung des molaren Volumens zwischen Produkt und Substrat (in m^3/mol). Auch diese Gleichung wird in aktueller Literatur verwendet [77–79]. Bereits in den 70er Jahren wurde dieser Effekt von Andersen und Broe bei einer Fumarase verwendet und mittels 1 000 MPa die Lage des Gleichgewichts verschoben [80]. Wie auch bei der Eyring-Gleichung wurden nicht ideale Verhalten der Gleichgewichtskonstante gefunden [81].

Durch die Volumenänderung wird die Sensitivität zum Druck ausgedrückt. Da diese bei Flüssigphasenreaktionen deutlich kleiner sind als bei Gasphasenreaktionen, wird dieser Effekt bei niedrigen Drücken häufig vernachlässigt [8, 9]. An dieser Stelle sei angemerkt, dass der Druck nicht beliebig erhöht werden kann, da auch die Viskosität des Mediums mit Druck zunimmt [82], was zu Diffusionslimitierungen führen kann.

Nicht nur die Reaktion (Geschwindigkeit oder Gleichgewicht) wird durch Druck beeinflusst, sondern auch die Enzyme selbst. So kann die Struktur [83], Hydrathülle [84] oder Flexibilität [81, 85] beeinflusst werden, was auch zu einer Erhöhten thermischen Stabilität führen kann [5, 86]. Während Berichte reversible Effekte beschrieben haben [87, 88] wurden auch anhaltende Wirkungen gefunden, welche zu erhöhten Aktivitäten führen nachdem der Druck wieder reduziert wurde [89]. Zuletzt sei aufgeführt, dass auch die Dichte von Wasser durch Druck beeinflusst werden kann. Literaturdaten zeigen, dass dieser Effekt bei den angewandten Drücken vernachlässigbar ist (vergleiche Tabelle 3.1) [90, 91].

Um die in diesem Abschnitt beschriebenen Druckeffekte zu untersuchen wurden verschiedenste Reaktoren verwendet. Die beiden gängigsten stellen einen unter Druck gesetzten Satzreaktor [4, 68, 92, 93] oder einen Stopped-Flow-Reaktor [70, 78, 94–96] dar. Diese Reaktoren haben den Nachteil, dass zur Bestimmung des Reaktionsverlaufs mehrere Reaktoren parallel gestartet und zu verschiedenen Zeitpunkten geöffnet werden [67, 97, 98]. Es gibt Forschungsgruppen, welche einem Festbettreaktor verwenden, bei welchen der gesamte Aufbau unter Druck steht [68]. Eine weitere Verwendung eines Festbettreaktors besteht in einem vollständig unter Druck gesetztem Umlaufreaktor, in welchem eine Kolbenpumpe arbeitet [52, 99].

In einem Literatur-Überblick zu kontinuierlich arbeitenden Reaktoren wird die Möglichkeit aufgeführt, dass Druck in dem Festbettreaktor mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Pumpe und einem Rückdruckregler (RDR) aufgebaut wird [100]. Vergleichbare Aufbauten wurden bei 2,5 MPa [101] oder 10 MPa [102] verwendet.

1.1.3 Kontinuierlich betriebene Reaktoren

Wie eingangs festgestellt, werden kontinuierlich arbeitende Reaktoren deutlich seltener verwendet als Satzreaktoren. Einige Journale veröffentlichten Sonderausgaben zu kon-

1 Einleitung

tinuierlichen Synthesen [103–105] und auch für die chemische Katalyse wird weiterhin großes Potential gesehen [106, 107].

Eine Herausforderung für kontinuierlich arbeitende Reaktoren ist der Rückhalt der Katalysatoren wohingegen das Reaktionsmedium in den Reaktor eintritt und diesen verlässt. Eine Art dies zu erreichen ist die Immobilisierung der Enzyme auf Partikeln [108], die mittels Filter zurückgehalten werden. Die beiden einfachsten Reaktortypen stellen der Festbettreaktor und der kontinuierlich arbeitende Rührkessel dar, welche gängiges Wissen darstellen und in Lehrbüchern zu finden sind [1, 109, 110]. Eine weitere Möglichkeit der Enzymretention besteht in der Verwendung eines Membranreaktors, mit welchem homogen gelöste Makromoleküle zurückgehalten werden. Ein solches System wurde bereits für die Synthese von Neu5Ac verwendet [41]. Auch die Immobilisierung von Epimerase und Aldolase auf Partikeln wurden bereits verwendet um Neu5Ac zu produzieren [24]. In den letzten Jahren wurden durch additive Fertigungsverfahren neben dem Festbettreaktor auch neuartige Strukturen zur Immobilisierung möglich [111].

1.2 Die Forschungsallianz protP.S.I.

Um die in Abschnitt 1.1 genannten Aspekte zu untersuchen, wurde die Forschungsallianz protP.S.I. (protein pressure specific activity impact) gegründet. Diese bestand sowohl aus industriellen, als auch aus akademischen Arbeitsgruppen und hatte sich zum Ziel gesetzt, Druck als neuen Prozessparameter zur Produktion im Bereich der Biokatalyse zu erschließen. Sowohl die industriellen, wie auch die akademischen Partner waren breit aufgestellt, um den Einfluss von Druck auf verschiedene Aspekte (von Messsystemen zu Enzymstrukturanalyse) zu untersuchen. Gefördert wurde die Allianz durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) mit dem Kennzeichen 031B0405A.

In der ersten Projektphase waren folgende Parteien involviert: Das Institut für technische Biokatalyse, das Institut für Mehrphasenströmung und das Institut für Bioprozesse und Biosysteme der Technischen Universität Hamburg, Bio Solve IT, Ingenieurbüro Dr.-Ing. Schoop, DESY, EMBL, GALAB Laboratories GmbH (GALAB), Hochschule Furtwangen, Horiba, Suna-Precision GmbH, PreSens - Precision Sensing GmbH (Projektleitung), Universität Hamburg, TuTech und SCHAEFER KALK GmbH & Co. KG.

Das in dieser Arbeit bearbeitete Projekt wurde in Zusammenarbeit mit GALAB (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Verwendet wurde eine Epimerase (EC 5.1.3.8) aus *Pedobacter heparinus* und eine Aldolase (EC 4.1.3.3) aus *Escherichia coli* K12. Beide Enzyme wurden durch GALAB in einem *E. coli* Stamm BL21(DE3) kloniert und immobilisiert [112].

2 Aufgabenstellung

In Kapitel 1 wurde der Stand der Technik verschiedener Bereiche aufgezeigt:

- Der Einsatz von Enzymen zur Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)
- Die Verwendung von Hochdruck (bis 130 MPa)
- Die Verwendung kontinuierlich arbeitender Reaktoren

Ziel dieser Arbeit ist es zunächst ein Reaktorsystem zu entwerfen, welches kontinuierlich arbeitet, zeitgleich Hochdruck im Reaktor aufweist und in welchem Neu5Ac synthetisiert werden kann. Das Reaktorsystem ist im Labormaßstab umzusetzen, die Verwendung eines Festbettreaktors zu untersuchen und dieser mit geeigneten Kenngrößen (zum Beispiel Verweilzeitverteilung) zu charakterisieren.

Mit dem realisierten Reaktor ist anschließend der Einfluss von Hochdruck auf die enzymatische Synthese zu untersuchen. Es ist zu untersuchen, inwieweit Hochdruck die Reaktionskinetik oder die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts beeinflusst und so die Produktivität erhöht werden kann. Dieser Einfluss ist mittels der kinetischen Parameter beziehungsweise der Gleichgewichtskonstanten zu quantifizieren. Der Einfluss von Druck ist dem monetären Aufwand der Druckerzeugung gegenüberzustellen, zu vergleichen und zu diskutieren.

Zur Synthese von Neu5Ac ist eine Reaktionssequenz zu etablieren, welche *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) und Pyruvat (Pyr) als Substrat verwendet. Für die Reaktionssequenz soll eine Epimerase (EC 5.1.3.8) aus *Pedobacter heparinus* und eine Aldolase (EC 4.1.3.3) aus *Escherichia coli* K12 verwendet werden. Die Abhängigkeit von Druck soll sowohl bei den Einzelreaktionen, als auch der zeitgleich ablaufenden Reaktion analysiert werden. Diese Ergebnisse sind auf Konsistenz zu prüfen.

Der Kooperationspartner GALAB Laboratories GmbH (GALAB) stellt die immobilisierten Enzyme, welche zu verwenden sind, bereit.

Folgende Anforderungen werden an den Reaktor gestellt:

1. Variation des Drucks bei konstanter Flussrate möglich
2. Der Druck ist annähernd konstant (Druckschwankungen können nicht vollständig vermieden werden. Maximal soll der Druck aber nur um $\pm 5\%$ schwanken.)
3. Einstellung von kurzen¹ Verweilzeiten (zur Messung der Reaktionsgeschwindigkeit)

¹Kurze oder lange Verweilzeiten sind in diesem Kontext relativ und hängen von der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms ab.

2 Aufgabenstellung

4. Einstellung von langen¹ Verweilzeiten (zur Messung des Reaktionsgleichgewichts) oder anderen Maßnahmen, um die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts zu untersuchen

3 Theorie

Dieses Kapitel bildet die Grundlage für die mathematische Beschreibung des Stands der Technik ab. Um den Reaktor und die darin ablaufenden Prozesse zu beschreiben, werden verschiedene Aspekte aufgeführt. Da es sich um eine enzymatisch-katalysierte Reaktion handelt, ist eine mathematische Beschreibung der Reaktionskinetik beziehungsweise der Enzymkinetik notwendig. Thermodynamische Gleichungen beschreiben Grundlegendes zum Reaktionsgleichgewicht. Das Strömungsverhalten des Reaktors wird mittels der Verweilzeitverteilung (VZV) beschrieben. Aus der Strömungsmechanik lässt sich zudem der Druckverlust über des Festbett des Reaktors berechnen. Um die Homogenität der Strömung innerhalb des Reaktors, sowie die Vergleichbarkeit verschiedener gepackter Festbetten sicherzustellen, wird die VZV verwendet. Zuletzt wird der Einfluss von Hochdruck (der Fokus dieser Arbeit) auf die Enzymkinetik und das Gleichgewicht beschrieben (zusätzlich zu Gleichung (1.1) und Gleichung (1.2)).

Um den Fortschritt und die Produktivität der gesamten Reaktionssequenz von *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) zu *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) (Abbildung 3.1) zu beschreiben, wird der Umsatz, die Selektivität und die Ausbeute verwendet [1]. Es sei angemerkt, dass bei der betrachteten Reaktion sämtliche stöchiometrischen Koeffizienten -1 beziehungsweise 1 sind und deshalb in den Gleichungen nicht dargestellt werden.

Der Umsatz beschreibt die relative Menge an Substrat, welche durch die Reaktion verbraucht wurde und kann über die Änderung von Substrat oder Produkt bestimmt werden. Wenn die Menge an Produkt verwendet wird, müssen sämtliche gebildete Produkte (*N*-Acetyl-D-mannosamin (ManNAc) und Neu5Ac) verwendet werden.

$$X(t) = \frac{n_S(0) - n_S(t)}{n_S(0)} = \frac{\sum n_{P,i}(t)}{n_S(0)} \tag{3.1}$$

Hierbei ist X der Umsatz (dimensionslos), t die Reaktionszeit (in s) und n die Stoffmenge von Substrat (n_S) oder Produkt i ($n_{P,i}$) (in mol).

Die Selektivität ist das Verhältnis des gewünschten Produkts j zu sämtlichen gebildeten Produkten. Anstelle sämtlicher gebildeter Produkte kann die Menge an reagiertem Substrat verwendet werden.

$$S(t) = \frac{n_{P,j}(t)}{\sum_i n_{P,i}(t)} = \frac{n_{P,j}(t)}{n_S(0) - n_S(t)} \tag{3.2}$$



Abbildung 3.1: Reaktionsschema der Reaktionssequenz.

3 Theorie

Mit S als Selektivität (dimensionslos). Für die vorliegende Reaktion stellt Neu5Ac das Produkt und ManNAc ein Nebenprodukt dar.

Die Ausbeute ist das Verhältnis von dem (gewünschten) Produkt zum eingesetzten Substrat und kann auch über Umsatz und Selektivität berechnet werden.

$$Y(t) = \frac{n_{P,j}(t)}{n_S(0)} = X(t) \cdot S(t) \quad (3.3)$$

Dabei ist Y die Ausbeute (dimensionslos).

3.1 Reaktionskinetik

Die Reaktionskinetik beschreibt im Allgemeinen die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit oder -rate von den vorliegenden Bedingungen. Dabei ist wesentlich, wie die Reaktionsgeschwindigkeit von der Edukt- oder Substratkonzentration abhängt. Die Reaktionsrate wird dazu verwendet, den Verlauf der an der Reaktion beteiligten Spezies vorherzusagen. Dabei wird folgende Differentialgleichung aufgestellt, welche die Reaktionsrate beinhaltet:

$$\frac{dc_i}{dt} = \xi_i \cdot v(\mathbf{c}, t, T, pH, \dots) \quad (3.4)$$

Hierbei ist c_i die Konzentration der Spezies i (in mol/m³), ξ_i der stöchiometrische Koeffizient der Komponente i (dimensionslos), v die Reaktionsrate (in mol/m³/s), \mathbf{c} als sämtliche vorliegende Konzentrationen (in mol/m³), pH der pH-Wert (dimensionslos). Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch einen Verlauf der Eduktkonzentration über die Zeit. Je nach Reaktionskinetik weist dieser Verlauf unterschiedliche Formen auf.

Für Elementarreaktionen (Reaktionen, die nicht weiter unterteilt werden können) gilt [7, 8]:

$$v = k \cdot \prod c_i^{|\xi_i|} \quad (3.5)$$

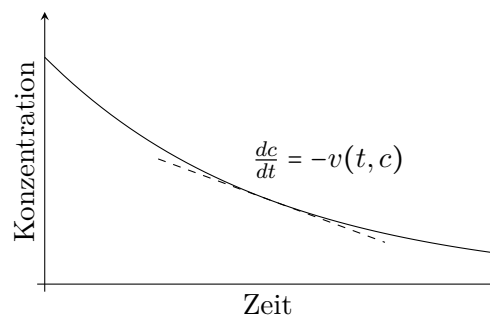


Abbildung 3.2: Substratkonzentration einer Reaktion über der Zeit.



Abbildung 3.3: Reaktionsschema nach Michaelis und Menten. k_1 (in $\text{m}^3/\text{mol}/\text{s}$), k_{-1} (in $1/\text{s}$) und k_2 (in $1/\text{s}$) sind Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten.

3.1.1 Enzymkinetik nach Michaelis-Menten

Selbst über 100 Jahre nach der ersten Veröffentlichung [113] wird die Theorie von Michaelis und Menten auch heute noch in der Literatur aufgeführt und zur Beschreibung von Reaktionskinetiken verwendet [1, 114–116]. Da die Arbeit von Henry Anfang des 20. Jahrhunderts als Basis für die Theorie gilt, wird auch von der Henry-Michaelis-Menten-Gleichung gesprochen [117].

Die Theorie beschreibt wie die Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration abhängt. Hierbei bindet das Substrat (S) zunächst an das aktive Zentrum des Enzyms (E) und bildet den Enzymsubstratkomplex (ES). Dieser Prozess ist reversibel. Das Substrat im Enzymsubstratkomplex wird dann zu dem Produkt umgewandelt und es bildet sich der Produktenzymkomplex (EP) von welchem das Produkt (P) irreversibel abgespalten wird. Hierbei ist die Annahme, dass die Bildung von EP deutlich schneller ist, sodass ES und EP effektiv zu einem Zustand zusammengefasst werden können. Abbildung 3.3 zeigt das resultierende Reaktionsschema.

Unter der Annahme, dass Gleichung (3.5) angewandt werden kann und dass sich der Enzymsubstratkomplex im Gleichgewicht mit dem Substrat und dem Enzym befindet, wurde folgende Gleichung hergeleitet:

$$v = \frac{v_{max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (3.6)$$

Mit v_{max} als maximale Reaktionsrate (in $\text{mol}/\text{m}^3/\text{s}$) und K_M als Michaelis-Menten-Konstante (in mol/m^3).

Die maximale Reaktionsrate v_{max} liegt vor, wenn sämtliche Enzyme als Enzymsubstratkomplex gebunden sind. Die Reaktionsrate der Reaktion ist in diesem Fall:

$$v = k_2 \cdot c_{E,0} = v_{max} \quad (3.7)$$

Mit $c_{E,0}$ als initiale Enzymkonzentration (in mol/m^3).

Somit hängt v_{max} sowohl von den kinetischen Eigenschaften des Enzymes (k_2) als auch von der Betriebsweise des Reaktors beziehungsweise der eingesetzten Enzymkonzentration ($c_{E,0}$) ab. Aus diesem Grund wird die maximale spezifische Aktivität $a_{sp,max}$ eingeführt.

$$v_{max} \left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \text{ s}} \right] = a_{sp,max} \left[\frac{\text{mol}}{\text{g s}} \right] \hat{c}_E \left[\frac{\text{g}}{\text{m}^3} \right] \quad (3.8)$$

Die Massenkonzentration der Enzyme im Reaktor ist \hat{c}_E (in g/m^3) und $a_{sp,max}$ als maximale spezifische Aktivität (in $\text{mol}/\text{s}/\text{g}$).

$$v = \frac{a_{sp,max} \cdot \hat{c}_E \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (3.9)$$

3 Theorie

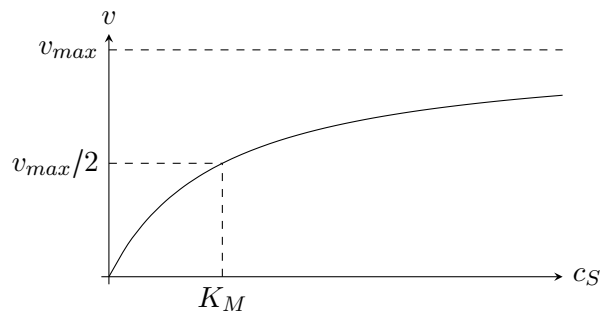


Abbildung 3.4: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (nach Michaelis-Menten).

Eine weit verbreitete Angabe, wenn auch keine SI-Einheit, der spezifischen Aktivität ist U/g. U steht hierbei für $\mu\text{mol}/\text{min}$ [118].

Die Definition der Michaelis-Menten-Konstante K_M ist laut der Theorie von Michaelis und Menten die Gleichgewichtskonstante der Substratbindung ($E + S \rightleftharpoons ES$) [113]. Später wurde auch von Briggs und Haldane unter der Annahme eines Fließgleichgewichts Gleichung (3.6) hergeleitet [119]. In diesem Fall wird K_M über Geschwindigkeitskonstanten berechnet:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.10)$$

Die Annahme des Fließgleichgewichts wird laut Cornish-Bowden im Allgemeinen als korrekt angenommen [117]. K_M wird auch als Maß für die Affinität des Substrates zum Enzym genommen [109, 120]. Dabei bedeuten kleiner Werte von K_M eine höhere Affinität.

Abbildung 3.4 zeigt grafisch wie die Reaktionsrate von der Substratkonzentration abhängt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit strebt asymptotisch gegen v_{max} . Anschaulich betrachtet ist dies der Punkt, an welchem alle Enzyme durchgehend mit Substrat gesättigt sind und die Reaktion katalysieren.

Im Falle, dass die Reaktionsgeschwindigkeit durch einen Stoff reduziert wird, wird von Inhibierung gesprochen [116]. Diese Moleküle können zum Beispiel an das Enzym binden, bevor das Substrat bindet und so die Substratbindung verhindern (vergleiche Abbildung 3.5).

K_I wird als Inhibierungskonstante für den Inhibitor (in mol/m^3) eingeführt und wird über die Geschwindigkeitskonstanten beziehungsweise die Gleichgewichtskonstante der Reaktion definiert.

$$K_I = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{c_E \cdot c_I}{c_{EI}} \quad (3.11)$$

Mit k_3 (in $\text{m}^3/\text{mol}/\text{s}$) und k_{-3} (in $1/\text{s}$) als Geschwindigkeitskonstanten, c_I als Inhibitor-konzentration (in mol/m^3) und c_{EI} als Konzentration des Inhibitorenzymkomplexes (in mol/m^3).

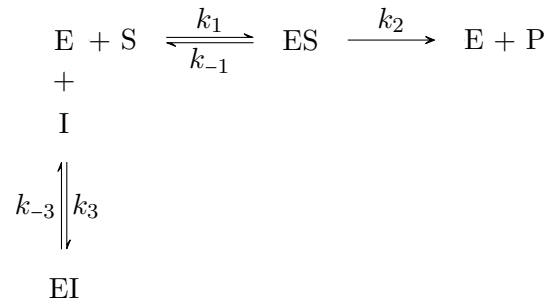


Abbildung 3.5: Erweiterung des Reaktionsschema nach Michaelis-Menten im Falle einer kompetitiven Inhibierung [1, 116].

Gleichung (3.6) wird entsprechend angepasst [116, 118]:

$$v = \frac{v_{max} \cdot c_S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) + c_S} \quad (3.12)$$

Die Bestimmung der Parameter wurde früher durch eine Linearisierung von Gleichung (3.6) und anschließender grafischer Auswertung erreicht. Modern werden die Parameter mittels nicht-linearer Regression berechnet [118].

Diese kinetischen Parameter stellen den Schlüssel für die Beschreibung der Reaktionskinetik (und damit die Auslegung von Reaktoren) dar. Ihre Wichtigkeit und die Beschreibung der Parameter kann deshalb nicht unterschlagen werden. Beispielhaft sei hier die Enzymdatenbank BRENDA angeführt, welche unter anderem kinetische Parameter aufführt und ihre Einträge aus Fachliteratur bezieht [121].

Zuletzt seien Alternativen zum Geschwindigkeitsausdruck von Michaelis-Menten aufgeführt. Johnson empfiehlt einen Umstieg auf einen Geschwindigkeitsausdruck durch k_{cat} und $k_{SP} = k_{cat}/K_M$, da der zweite Parameter (k_{SP}) aussagekräftiger sei [122].

$$v = \frac{k_{SP} \cdot c_S}{1 + \frac{k_{SP}}{k_{cat}} \cdot c_S} \quad (3.13)$$

Johnson schreibt dazu auch, dass die Berechnung der Parameter direkt bei der Regression angepasst werden und k_{SP} nicht aus zuvor bestimmten k_{cat} und K_M berechnet werden sollte.

Da die Aldolase eine 2-zu-1-Reaktion katalysiert ist dieses Vorgehen nur begrenzt umsetzbar, da zwei verschiedene K_M Werte vorhanden sind (Abschnitt 3.1.3).

Andere Autoren empfehlen anstelle der Verwendung von Konzentrationen die Nutzung der thermodynamischen Mischungsaktivität [123, 124]

3.1.2 Kinetik der Epimerase

Um die mathematische Gleichung der Reaktionsrate aufzustellen, muss der Mechanismus der Reaktion bekannt sein [7]. Wang und Mitarbeiter haben 2016 eine Epimerase aus *Pedobacter heparinus* untersucht und einen Mechanismus aufgrund von Kernspinresonanz

(NMR)-Ergebnissen vorgeschlagen, welcher an den Aminosäuren Glutaminsäure und Arginin stattfindet, welche auch im aktiven Zentrum vieler anderer Epimerasen zu finden seien [125].

Andere Arbeitsgruppen konnten zuvor erfolgreich Gleichung (3.14) verwenden, um die Reaktionsrate zu beschreiben [42, 50]. Hierbei wurden Inhibierungen durch Pyruvat (Pyr) und Neu5Ac festgestellt.

$$v = \frac{\vec{v}_{max} \frac{c_G}{K_M^G} - \overleftarrow{v}_{max} \frac{c_M}{K_M^M}}{1 + \frac{c_G}{K_M^G} + \frac{c_M}{K_M^M} + \frac{c_P}{K_M^P} + \frac{c_N}{K_M^N}} \quad (3.14)$$

Hierbei ist \vec{v}_{max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Hinreaktion (in mol/m³/s), \overleftarrow{v}_{max} die der Rückreaktion (in mol/m³/s), c_G die Konzentration von GlcNAc, c_M die von ManNAc, c_P die von Pyr und c_N die von Neu5Ac (in mol/m³) und $K_M^{G,M,P,N}$ die entsprechende Michaelis-Menten-Konstante (in mol/m³).

Viele Epimerasen benötigen die Anwesenheit von Adenosin triphosphat (ATP) [24, 49] und MgCl₂ [47], weshalb diese Stoffe der Reaktion zugesetzt werden müssen. Kragl zeigte, dass die Reaktionsrate ab 1 mM ATP und 1 mM MgCl₂ konstant war [41]. Werden höhere Konzentrationen verwendet, ist die Reaktionsrate unabhängig von diesen.

3.1.3 Kinetik der Aldolase

Es ist seit längerem bekannt, dass der Reaktionsmechanismus der Aldolase mittels eines geordneten bi-uni-Mechanismus beschrieben werden kann [41, 42, 126, 127]. Hierbei bindet Pyr zuerst an das aktive Zentrum der Aldolase und ManNAc bindet anschließend. Andere Gruppen untersuchen die exakten Aminosäuren, welche das aktive Zentrum des Enzyms bilden [51, 127].

Für „steady-state“ geordnete 2-zu-1-Reaktionen wurde von Cleland mittels der Methodik von King und Altman ein Geschwindigkeitsausdruck hergeleitet [128], welcher von verschiedenen Arbeiten für eine Aldolase adaptiert und modifiziert wurde [41, 42]. Änderungen der Reaktionsrate aufgrund von erhöhter Viskosität werden durch die Erweiterung mittels eines Korrekturparameters (c_η bzw. K_v) abgebildet.

$$v = c_\eta \frac{\vec{v}_{max} \frac{c_M \cdot c_P}{K_I^P \cdot K_M^M} - \overleftarrow{v}_{max} \frac{c_N}{K_M^N}}{1 + \frac{c_P}{K_I^P} + \frac{K_M^P \cdot c_M}{K_I^P \cdot K_M^M} + \frac{c_M \cdot c_P}{K_I^P \cdot K_M^M} + \frac{c_N}{K_M^N} + \frac{c_N \cdot c_M}{K_I^M \cdot K_M^N}} \quad (3.15)$$

Mit c_η als Korrekturparameter (dimensionslos), K_I^P als Inhibierungskonstante für Pyr (in mol/m³) und K_I^M als Inhibierungskonstante für ManNAc (in mol/m³).

$$c_\eta = \frac{1}{1 + \frac{\sum c_{i,0}}{K_v}} \quad (3.16)$$

K_v stellt einen Korrekturparameter dar.

Groher und Hoelsch verglichen in ihrer Arbeit den „steady-state“-Ansatz mit einem neuen „rapid-equilibrium“-Ansatz. Deren Ergebnisse wiesen auf einen „rapid-equilibrium“-Mechanismus hin [43], welcher von späteren Arbeiten adaptiert wurde [50].

Im „steady-state“-Ansatz wird die Gleichung für die Reaktionsrate mittels der Annahme hergeleitet, dass sich der Enzymsubstratkomplex im Fließgleichgewicht befindet ($\frac{dc_{ES}}{dt} = 0$), während bei der Herleitung mittels des „rapid-equilibrium“-Ansatzes ein thermodynamisches Gleichgewicht angenommen wird [41].

$$v = \frac{\vec{v}_{max} \frac{c_M}{K_M^M} \frac{c_P}{K_M^P} - \overset{\leftarrow}{v}_{max} \frac{c_N}{K_M^N}}{1 + \frac{c_P}{K_M^P} + \frac{c_M c_P}{K_M^M K_M^P} + \frac{c_N}{K_M^N}} \quad (3.17)$$

Die Rückreaktion ist in Gleichungen (3.15) und (3.17) identisch. Sind die Konzentrationen von ManNAc und Pyr null, vereinfachen sich beide Gleichungen zum Ansatz von Michaelis-Menten (Gleichung (3.6)), welcher auch von einigen Autoren verwendet wird [127].

Andere Autoren verwenden einen Michaelis-Menten-Ansatz mit zwei Substraten auch für die Hinreaktion [44]. Der Geschwindigkeitsausdruck aus zwei Michaelis-Menten-Termen ist identisch zu dem, welcher bei zufälliger Bindungsreihenfolge erhalten wird [115].

$$v = v_{max} \cdot \frac{c_M}{K_M^M + c_M} \cdot \frac{c_P}{K_M^P + c_P} \quad (3.18)$$

3.1.4 Immobilisierung von Enzymen auf einem Träger

Da in dieser Arbeit ein Festbettreaktor verwendet werden soll, musste die Zurückhaltung der Enzyme im Reaktor gewährleistet sein. Bei Festbettreaktoren ist die Immobilisierung der Enzyme auf Partikeln etabliert [110]. Aus diesem Grund wurden beide Enzyme kovalent auf Trägern gebunden [112].

Zwar ist es wünschenswert, dass alle Partikel die selben Eigenschaften wie Größe oder Oberfläche haben, häufig muss aber die Partikelgrößenverteilung berücksichtigt werden [129]. Die Dichteverteilung ($q(d_{Par})$) beschreibt, wie hoch der Anteil ($Q(d_1)$) an Partikel kleiner als der Durchmesser d_1 ist [129].

$$Q(d_1) = \int_0^{d_1} q(d_{Par}) dd_{Par} \quad (3.19)$$

Mit Q als Summenverteilung (dimensionslos), d_{Par} dem Durchmesser der Partikel (in m), d_1 als obere Grenze einer Partikelklasse (in m) und q als Dichteverteilung (in 1/m).

Wurden die Partikel in verschiedene Kategorien klassifiziert, gibt es verschiedene Möglichkeiten, diese zu gewichten. Beispielhaft seien hier die Anzahl- und die Massenverteilung angebracht [129].

Bei der Anzahlverteilung ($q_0(d_{Par})$) werden die Partikel in den verschiedenen Durchmesserklassen gezählt. Hier ist ein kleiner Partikel gleich einem großem Partikel gewichtet.

Bei der Massenverteilung ($q_3(d_{Par})$) wird der Anteil der Partikelklassen an der Gesamtmasse bestimmt. Ein großer Partikel beinhaltet hier mehr Masse als ein kleiner Partikel und wird deshalb stärker gewichtet. Die Einheit ist bei beiden Dichteverteilungen 1/m.

3.1.5 Diffusionslimitierung

Neben der Stoffumwandlung vom Substrat zum Produkt am Enzym treten Diffusionseffekte auf [8]. Diese bestehen darin, dass das Substrat zunächst durch die Grenzschicht zum Katalysator diffundieren muss [130]. Hauptsächlich wird zwischen Film- und Porendiffusion unterschieden [130].

Sollte die Film- oder Porendiffusion des Substrats zum Enzym langsamer als die Reaktionsrate sein, wird von einer Diffusionslimitierung gesprochen. In diesem Fall wird eine scheinbare Reaktionsrate beobachtet, welche sich von der Rate unterscheidet, welche ohne Diffusionslimitierung vorliegt. Dabei überlagern sich Diffusions- und Reaktionseffekte.

Um den Effekt von Druck auf die Reaktionsrate isoliert zu untersuchen, muss deshalb eine Diffusionslimitierung ausgeschlossen werden.

Porendiffusion

Die Porendiffusion beschreibt die Diffusion des Substrats innerhalb der Poren der Partikel. Zur mathematischen Beschreibung von Porendiffusion ist das Thiele-Modul sowohl in der chemischen Katalyse [8, 131], als auch in der Biotechnologie etabliert [132]. Mit dem Thiele-Modul kann der Porenwirkungsgrad berechnet werden, welcher die Reduktion der zu beobachtenden Reaktionsrate aufgrund von Diffusion beschreibt. Das Thiele-Modul ist dabei abhängig von der Reaktionsordnung.

$$\Phi = \begin{cases} L_{Par} \sqrt{\frac{k}{D}} & \text{1. Ordnung} \\ L_{Par} \sqrt{\frac{k}{D c_{S,\infty}}} & \text{0. Ordnung} \\ L_{Par} \sqrt{\frac{v}{D \cdot c_{S,\infty}}} = L_{Par} \sqrt{\frac{v_{max}}{(K_M + c_{S,\infty}) \cdot D}} & \text{allgemein} \end{cases} \quad (3.20)$$

Hierbei steht Φ für das Thiele-Modul (dimensionslos), L_{Par} für die charakteristische Länge der Partikel (in m), D für den Diffusionskoeffizienten (in m^2/s), $c_{S,\infty}$ für die Substratkonzentration im Medium unendlich weit vom Partikel entfernt (in mol/m^3). Das Thiele-Modul hängt auch von der Geometrie der Partikel ab. Für Gleichung (3.20) wurden kugelförmige Träger angenommen.

Anders als bei Gasen, bei welchen der Diffusionskoeffizient vom Druck abhängt, wird der Koeffizient in Flüssigkeiten durch die Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben [133].

$$D = \frac{k_B T}{3\tau_o \eta R_0} \quad (3.21)$$

Mit k_B als Boltzmann-Konstante ($1,381 \dots \text{J}/\text{K}$), τ_o als Kreiszahl, η als dynamische Viskosität (in Pa s) und R_0 als den hydrodynamischen Radius der Teilchen, die diffundieren (in m).

Da das Thiele-Modul proportional zum Durchmesser der Partikel ist, kann der Effekt der Porendiffusion durch Zerkleinern der Partikel reduziert werden [130].

Filmdiffusion

Bei der Filmdiffusion ist die Strömungsgrenzschicht um die Partikel entscheidend. Aus diesem Grund hängt die beobachtete Reaktionsrate in diesem Fall unter anderem von der Strömungsgeschwindigkeit ab [8].

Mit ausreichend hoher Strömungsgeschwindigkeit wird die Grenzschicht dünn und damit der Konzentrationsgradient ausreichend hoch, um die Filmdiffusion zu erhöhen [130]. Experimentell wird mittels dieses Effekts auf Filmdiffusionslimitierung getestet: Die Strömungsgeschwindigkeit wird variiert und die Reaktionsrate vermessen.

3.2 Thermodynamisches Gleichgewicht

Die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts für folgende Reaktion



wird mittels der Gleichgewichtskonstanten K_a (dimensionslos) charakterisiert und über die Mischungsaktivitäten der Reaktanten berechnet [7–9, 134].

$$K_a = \prod a_i^{\xi_i} \quad (3.23)$$

Mit a_i als Aktivität von Komponente i in der Mischung (dimensionslos). Hierbei ist die Konvention, dass Substrate/Edukte negative stöchiometrische Faktoren ξ_i aufweisen.

Die Aktivität jeder Komponente wird dabei über den Aktivitätskoeffizienten und den Molenbruch berechnet:

$$a_i = \gamma_i \cdot x_i \quad (3.24)$$

Mit γ_i als Aktivitätskoeffizienten (dimensionslos) und x_i als Molenbruch (dimensionslos).

Analog zu Gleichung (3.23) werden auch Gleichgewichtskonstanten über die Molenbrüche (K_x), Aktivitätskoeffizienten (K_γ), Fugazitäten (K_f), Molalitäten (K_m) oder Konzentrationen (K_c) definiert. K_c weist durch die Berechnung über Konzentrationen als einzige eine Einheit auf, wenn die Anzahl an Substraten und Produkten unterschiedlich ist (z.B. bei einer 2-zu-1 oder 1-zu-2-Reaktion). Thermodynamisch betrachtet ist jedoch nur K_a die Gleichgewichtskonstante einer Reaktion.

Die verschiedenen Definitionen der Konstanten können in Beziehung gesetzt werden, wenn die Aktivität in Abhängigkeit von Aktivitätskoeffizienten, Molenbrüchen oder Konzentrationen ausgedrückt wird. Der Molenbruch x_i der Reaktanten kann über die Konzentrationen berechnet werden:

$$x_i = \frac{c_i}{\sum_j^N c_j} \quad (3.25)$$

Mit N als Anzahl der vorliegenden Spezies (dimensionslos).

Die Konzentration von Wasser beträgt 55,5 mol/L und die Konzentration von anderen Komponenten betragen in dieser Arbeit maximal 1 mol/L. Somit ist $\sum_j^N c_j$ annähernd konstant und die Aktivitätskoeffizienten wurden wegen der niedrigen Konzentration

3 Theorie

mit 1 approximiert. Somit folgt, dass die Gleichgewichtskonstante proportional zu der konzentrationenbasierten Gleichgewichtskonstante ist.

$$K_a = \underbrace{K_\gamma}_{\approx 1} \cdot K_x = \prod x_i^{\xi_i} \propto \underbrace{\prod c_i^{\xi_i}}_{K_c} \quad (3.26)$$

Denbigh schrieb explizit, dass die Abhängigkeiten von Druck und Temperatur beibehalten werden, wenn K_m verwendet wird [134]. Bei dem selben Lösungsmittel ist die Molalität proportional zur Konzentration [7].

In dieser Arbeit wird mit Konzentrationen gearbeitet und die Gleichgewichtskonstante deshalb über die Konzentrationen bestimmt.

Die konzentrationenbasierte Gleichgewichtskonstante macht deutlich, wie der Zusammenhang der Konzentrationen der Reaktanten und K_c ist: Ist ein System im Gleichgewicht und sind 0,5 mol/L Produkt und 2 mol/L Substrat vorzufinden, gilt $K_c = 0,25$. Ist die Zusammensetzung hingegen 3 mol/L Produkt und 0,2 mol/L Substrat, ist $K_c = 15$. Die Knallgasreaktion besitzt Vollumsatz und eine Gleichgewichtskonstante von $1 \cdot 10^{40}$ [135].

Somit ist die konzentrationenbasierte Gleichgewichtskonstante für die Epimerisierung:

$$K_{Epi} = \left. \frac{c_M}{c_G} \right|_{\text{Gleichgewicht}} \quad (3.27)$$

Mit K_{Epi} als konzentrationenbasierte Gleichgewichtskonstante der Epimerisierung (dimensionslos). Und für die Aldol-Reaktion:

$$K_{Aldol} = \left. \frac{c_N}{c_M \cdot c_P} \right|_{\text{Gleichgewicht}} \quad (3.28)$$

Mit K_{Aldol} als konzentrationenbasierte Gleichgewichtskonstante der Aldol-Reaktion (in m^3/mol).

Entsprechend kann ein Gleichgewichtsumsatz eingeführt werden. Im Falle der Epimerase hängt dieser nicht von der Startkonzentration der Substrate ab.

$$K_{Epi} = \frac{c_{G,0} \cdot X_{GGW}}{c_{G,0} \cdot (1 - X_{GGW})} \quad (3.29)$$

Mit X_{GGW} als Gleichgewichtsumsatz (dimensionslos) und $c_{G,0}$ als Startkonzentration von GlcNAc (in mol/m^3). Der Gleichgewichtsumsatz kann direkt mittels der Gleichgewichtskonstanten bestimmt werden:

$$X_{GGW} = \frac{K_{Epi}}{1 + K_{Epi}} \quad (3.30)$$

Im Falle der Aldol-Reaktion verbleiben die Startkonzentrationen in der Gleichung. Für Gleichung (3.31) wurde angenommen, dass die Konzentration von Pyr höher als die von ManNAc ist. Somit ist ManNAc die limitierende Komponente und der Umsatz entsprechend durch die Konzentration von ManNAc berechnet.

3.2 Thermodynamisches Gleichgewicht

$$K_{Aldol} = \frac{c_{M,0} \cdot X_{GGW}}{c_{M,0} \cdot (1 - X_{GGW}) \cdot (c_{P,0} - c_{M,0} X_{GGW})} \quad (3.31)$$

Mit $c_{M,0}$ als Startkonzentration von ManNAc (in mol/m³), $c_{P,0}$ als Startkonzentration von Pyr (in mol/m³). Das Verhältnis der Startkonzentrationen von Pyr zu ManNAc wird im Folgenden α genannt.

$$\alpha = \frac{c_{P,0}}{c_{M,0}} \quad (3.32)$$

Mit α als eingesetztes Substratverhältnis (dimensionslos). Das Umformen von Gleichung (3.31) liefert zwei Lösungen, wovon eine verworfen wird, da für diese Lösung der Umsatz größer als 1 wäre.

$$X_{GGW} = \frac{1 + \alpha + \frac{1}{c_{M,0} K_{Aldol}}}{2} - \sqrt{\left(\frac{1 + \alpha + \frac{1}{c_{M,0} K_{Aldol}}}{2}\right)^2 - \alpha} \quad (3.33)$$

Gleichung (3.31) kann auch umgestellt werden, um das Verhältnis der Substrate zu bestimmen, wenn ein bestimmter Gleichgewichtsumsatz (bei gegebenem K) gefordert ist:

$$\alpha = \frac{X_{GGW}}{(1 - X_{GGW}) c_{M,0} K_{Aldol}} + X_{GGW} \quad (3.34)$$

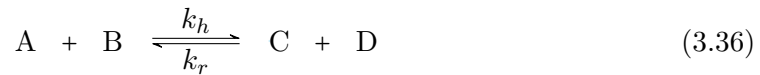
Da K das Verhältnis der Konzentrationen der Reaktanten nach unendlich langer Zeit darstellt, kann das Verhältnis über den Reaktionsverlauf berechnet werden. Dieses Verhältnis strebt gegen K .

$$\kappa(t) = \frac{c_P(t)}{c_S(t)} \quad \text{mit} \quad \lim_{t \rightarrow \infty} \kappa(t) = K_c \quad (3.35)$$

Mit c_P als Produktkonzentration (ggf. mehrere) (in mol/m³) und c_S als Substratkonzentration (ggf. mehrere) (in mol/m³).

3.2.1 Zusammenhang zu kinetischen Parametern - Haldane-Beziehung

Im thermodynamischen Gleichgewicht ist die Reaktionsrate der Hinreaktion und Rückreaktion identisch. Aus diesem Grund kann die Lage des Gleichgewichts aus der Reaktionskinetik bestimmt werden.



Wenn das System im Gleichgewicht ist, ist die globale Reaktionsrate 0:

$$v = k_h \cdot c_{A,\infty} \cdot c_{B,\infty} - k_r \cdot c_{C,\infty} \cdot c_{D,\infty} = 0 \quad (3.37)$$

$$\frac{k_h}{k_r} = \frac{c_{C,\infty} \cdot c_{D,\infty}}{c_{A,\infty} \cdot c_{B,\infty}} = K \quad (3.38)$$

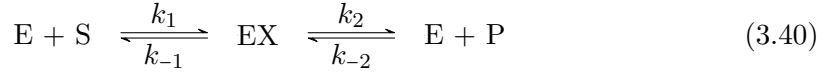
3 Theorie

Ein ähnliches Vorgehen ist auch bei enzymkatalysierten Reaktionen möglich. Der Zusammenhang zwischen v_{max} und K_M (jeweils Hin- und Rückreaktion) wird Haldane-Beziehung genannt [115].

$$K = \frac{\vec{v}_{max}}{\overleftarrow{v}_{max}} \cdot \frac{K_{M,P}}{K_{M,S}} \quad (3.39)$$

Mit $K_{M,S}$ als Michaelis-Menten-Konstante des Substrates (in mol/m³) und $K_{M,P}$ als Michaelis-Menten-Konstante des Produktes (in mol/m³).

Für die Herleitung wird der Reaktionsmechanismus ausgeschrieben und die Gleichgewichtskonstante entsprechend aus den zwei Einzelreaktionen zusammengesetzt (Gleichung (3.45)) und Gleichung (3.38) verwendet. Die eigentliche Reaktion von Substrat zu Produkt im Enzymkomplex ist hinreichend schnell, sodass ES und EP zu einem Enzymkomplex (EX) zusammengefasst werden.



Die Gleichgewichtskonstante einer Reaktionssequenz kann über das Produkt der Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte berechnet werden:

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} \cdot \frac{k_2}{k_{-2}} \quad (3.41)$$

Gleichung (3.41) wird um $k_{-1} + k_2$ und $c_{E,0}$ erweitert um K_M beziehungsweise v_{max} einzusetzen.

$$K_{M,S} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.42a)$$

$$K_{M,P} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad (3.42b)$$

Somit folgt:

$$\frac{K_{M,P}}{K_{M,S}} \cdot \frac{\overbrace{k_2 \cdot c_{E,0}}^{\vec{v}_{max}}}{\underbrace{k_{-1} \cdot c_{E,0}}_{\overleftarrow{v}_{max}}} = \frac{\cancel{k_{-1} + k_2}}{k_{-2}} \cdot \frac{k_1}{\cancel{k_{-1} + k_2}} \cdot \frac{k_2}{k_{-1}} \stackrel{Gl.3.41}{=} K \quad (3.43)$$

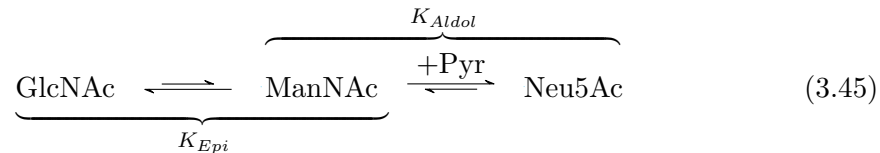
Da es sich bei der Epimerisierung um eine 1-zu-1-Reaktion handelt, kann die Haldane-Beziehung direkt angewandt werden.

Bei der Aldol-Reaktion kann die Haldane-Beziehung ermittelt werden, indem der Zähler des Geschwindigkeitsausdrucks (Gleichung (3.17)) gleich 0 gesetzt wird [43].

$$K_{Aldol} = \frac{\vec{v}_{max}}{\overleftarrow{v}_{max}} \frac{K_M^N}{K_M^M K_M^P} \quad (3.44)$$

3.2.2 Gekoppelte Reaktionen

Allgemein ist es möglich, die Gleichgewichtskonstante einer Folgereaktion durch das Produkt der Gleichgewichtskonstanten der Einzelreaktionen zu berechnen. Für das vorliegende System bedeutet dies, dass die Gleichgewichtskonstante der gekoppelten Reaktion über GlcNAc, Pyr und Neu5Ac berechnet wird. Dieser Ansatz wurde bei dem betrachteten System bereits verwendet [41].



$$K_{ges} = K_{Epi} \cdot K_{Aldol} = \frac{c_N}{c_{MCP}} \Big|_{\text{Gleichgewicht}} \quad (3.46)$$

Mit K_{ges} als Gleichgewichtskonstante der gesamten Reaktionssequenz (in m^3/mol).

3.3 Festbettreaktor

Makroskopisch betrachtet ähneln Festbettreaktoren Strömungsrohren. So können Massenbilanzen von Strömungsrohren mit einigen Anpassungen auch für Festbettreaktoren verwendet werden. Ein wichtiger Unterschied ist die Tatsache, dass im Festbettreaktor eine weitere Phase vorliegt, welche mit dem Fluid (den Fluiden) interagiert. Abbildung 3.6 zeigt schematisch das Innere eines solchen Reaktors. Angemerkt sei, dass bei industriell eingesetzten Festbettreaktoren der Radius des Reaktors in der Regel deutlich größer als der Radius der Partikel ist, um Randeffekte in der Nähe der Reaktorwand zu vermeiden und Partikel zu verwenden, die ähnlich groß sind.

Wie Strömungsrohre, arbeiten Festbettreaktoren in der Regel stationär, was beschreibt, dass keine Änderung mit der Zeit existiert. Zudem wird die Strömung durch den Reaktor mit dem Volumenstrom \dot{V} (beziehungsweise der Strömungsgeschwindigkeit w) beschrieben [136]. Zusätzlich muss auch die Porosität des Festbettes (das Volumen zwischen den Partikeln) beachtet werden, da das Festbett keine homogene Phase im Reaktor bildet [137, 138]. Aus diesem Grund kann es in Festbettreaktoren zu sogenannter Randgängigkeit kommen. Hierbei sinkt der volumetrische Anteil an Partikeln nahe der Wand und die Strömung ist durch den geringeren Widerstand schneller [138, 139]. Mittels Simulation und Messung wurde von Reyneke und Du Toit festgestellt, dass das Fluid am Rand des Reaktors bis zu dreifach schneller fließt als in der Mitte [139].

Die Porosität des Festbettes ist nicht mit der Porosität der einzelnen Partikel zu verwechseln, welche die Struktur des Materials und Leerräume innerhalb des Partikels beschreibt. In einem Festbett füllt das Fluid sowohl das Volumen zwischen den einzelnen Partikeln, als auch das Volumen innerhalb dieser aus.

Der volumetrische Anteil des Fluids ist das Verhältnis zwischen dem Volumen, welches durch das Fluid eingenommen werden kann bezogen auf das Volumen des gesamten

3 Theorie

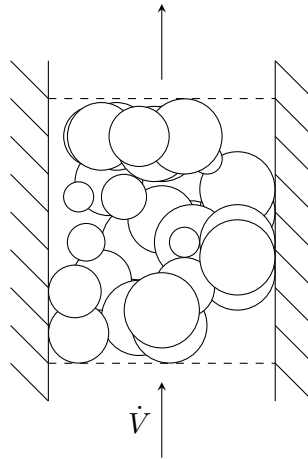


Abbildung 3.6: Unregelmäßige Schüttung eines Festbettes bestehend aus unterschiedlich großen Partikeln.

Reaktors.

$$\nu_f = \frac{V_{Fluid}}{V_{Rea}} \quad (3.47)$$

Mit ν_f als volumetrischen Anteil des Fluids (dimensionslos), V_{Fluid} als Volumen vom Fluid (in m^3) und V_{Rea} als Volumen des Reaktors (in m^3). Entsprechend ist der volumetrische Anteil des Feststoffes:

$$\nu_s = \frac{V_{Kat}}{V_{Rea}} \quad (3.48)$$

Mit ν_s als volumetrischer Anteil des Feststoffes (dimensionslos) und V_{Kat} als Volumen vom Katalysator (in m^3).

Randgängigkeit kann unter anderem über der Vermessung der VZV festgestellt werden (Abschnitt 3.3.1).

Um Reaktionen im Festbettreaktor zu beschreiben, wird im Folgenden die Strömung als homogen angenommen (Herleitung siehe Anhang C.2). Mittels einer Molbilanz wird die Änderungsrate der Konzentrationen mit Reaktionsrate und Parametern zur Strömung (\dot{V} beziehungsweise w) verbunden:

$$\frac{dc_i}{dx} = \xi_i v \cdot \frac{1}{w} = \xi_i v \cdot \frac{A_c \cdot \nu_f}{\dot{V}} \quad (3.49)$$

Mit w als Strömungsgeschwindigkeit (in m/s), A_c als Querschnittsfläche des Reaktors (in m^2) und \dot{V} als Volumenstrom des Fluids (in m^3/s). Wird Gleichung (3.49) gelöst, ergeben sich Konzentrationsprofile über die Länge des Reaktors, welche entsprechend von der Strömungsgeschwindigkeit abhängen (Abbildung 3.7).

Deutlich zu erkennen sind mehrere Phänomene:

- Bei hohen Flussraten/kleinen Verweilzeiten nimmt die Konzentration des Substrats annähernd linear mit dem Ort ab

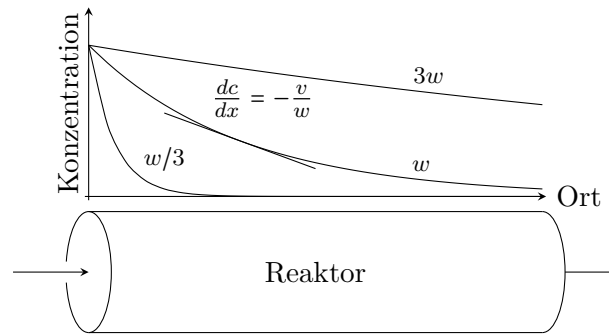


Abbildung 3.7: Konzentrationsverlauf über die Länge des Reaktors. Mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit ($3w > w > w/3$) nimmt die Verweilzeit des Fluids ab, wodurch das Substrat schneller aus dem Reaktor ausgetragen wird.

- Bei niedrigen Flussraten haben die Reaktanten im Fluid genügend Zeit um das Reaktionsgleichgewicht zu erreichen
- Bei niedrigen Flussraten ändert sich die Konzentration ab einem Punkt im Reaktor nicht mehr. Änderungen im Reaktor (z.B. Deaktivierung der Enzyme) verschieben zwar diesen Punkt, die austretenden Konzentrationen sind jedoch identisch und die Reaktion erscheint unbeeinflusst.

Kontinuierlich arbeitende Reaktoren werden häufig über die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) charakterisiert [1, 140]. Diese wird über den austretenden Massenstrom des Produktes, sowie das Reaktionsvolumen bestimmt [141].

$$\eta_{RZA} = \frac{\dot{m}_P}{V_{Rea}} \quad (3.50)$$

Hierbei steht η_{RZA} für die Raum-Zeit-Ausbeute (in kg/s/m^3) und \dot{m}_P für den Massenstrom des Produktes (in kg/s), welcher aus dem Reaktor austritt.

3.3.1 Verweilzeitverteilung

Ähnlich wie die Partikelgrößenverteilung, ist auch die Verweilzeitverteilung (VZV) des Reaktors zu berücksichtigen [8]. VZV sind in der chemischen Industrie hinreichend untersucht und in gängiger Literatur zu finden [8, 131]. Der einfachste Ansatz ist anzunehmen, dass alle Fluidelemente den Reaktor gleich schnell durchströmen und nach der selben Verweilzeit verlassen. Daraus ergibt sich die hydrodynamische Verweilzeit (τ). Dabei wird das Volumen, welches vom Fluid eingenommen werden kann (V_{Fluid}), und nicht das gesamte Volumen des Reaktors verwendet.

$$\tau = \frac{V_{Fluid}}{\dot{V}} \quad (3.51)$$

Mit τ als Verweilzeit eines Fluidelementes (in s).

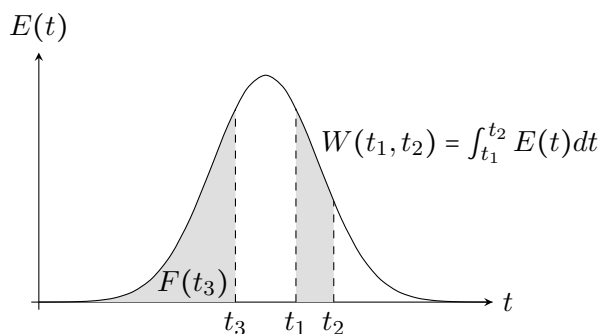


Abbildung 3.8: Beispielhafte Verweilzeitverteilung mit Berechnung der Wahrscheinlichkeit ($W(t_1, t_2)$), dass ein Fluidelement das System zwischen t_1 und t_2 verlässt [142].

Bei nicht vollständig homogenem Fließverhalten (zum Beispiel Randgängigkeit oder entsprechenden Strömungsprofilen) fließen manche Fluidelemente schneller als andere und verlassen den Reaktor deshalb früher (vgl. Abschnitt 3.3.2). Aufgrund dieser Inhomogenitäten, muss Gleichung (3.51) erweitert werden. Gängig ist hier die VZV ($E(t)$) und die Summenverteilung ($F(t)$). $E(t)$ ist über die Wahrscheinlichkeit definiert, die ein Fluidelement eine bestimmte Zeit t im System verweilt (vgl. Abbildung 3.8).

$F(t)$ stellt die Wahrscheinlichkeit dar, dass ein Fluidelement zwischen 0 und t im System verweilt. Durch diese Definition sind $E(t)$ und $F(t)$ über Stammfunktion und Ableitung verknüpft:

$$F(t) = \int_0^t E(t) dt \quad (3.52a)$$

Mit $E(t)$ als Verweilzeitverteilung (in 1/s) und $F(t)$ als Verweilzeitsummenverteilung (dimensionslos).

$$E(t) = \frac{dF(t)}{dt} \quad (3.52b)$$

Zur Vermessung der VZV sind zwei Methoden gängig [8]: In der einen wird das System zunächst mit einer gegebenen Konzentration eines Zielstoffes durchströmt und zu einem definierten Zeitpunkt die Konzentration am Eingang des Reaktors geändert (Heaviside-Stufenfunktion). Indem die Konzentration am Ausgang des Reaktors gemessen wird, wird $F(t)$ bestimmt.

$$F(t) = \frac{S_M(t)}{S_{M,\infty}} \quad (3.53)$$

Hierbei ist S_M ein Messsignal (willkürliche Einheit) und $S_{M,\infty}$ das Signal nach hinreichend langer Zeit (willkürliche Einheit).

Mittels der Ableitung von $F(t)$ wird anschließend $E(t)$ berechnet. Da diskrete Messpunkte vorhanden sind, wird die Funktion numerisch abgeleitet (Anhang A).

Die andere Methode zur Vermessung der VZV besteht darin, dass die Konzentration eines Zielstoffes nur kurz geändert wird (Dirac-Puls). Die VZV $E(t)$ wird dann aus dem

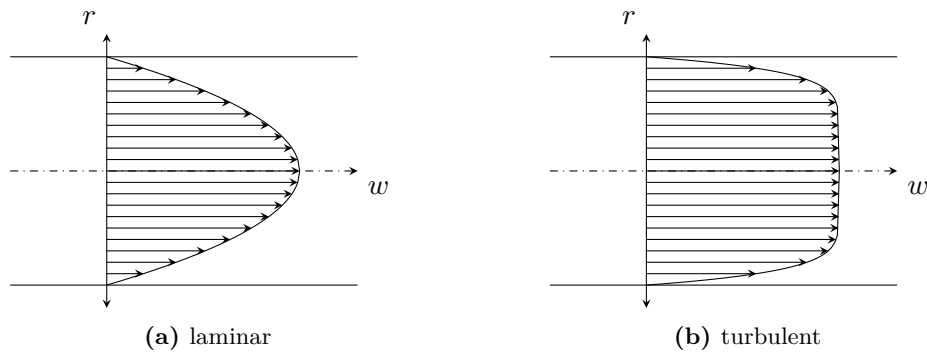


Abbildung 3.9: Darstellung verschiedener Geschwindigkeitsprofile in einem Rohr. Darstellung nach [143].

Signal am Ausgang berechnet und entsprechend normiert.

$$E(t) = \frac{S_M(t)}{\int_0^\infty S_M(t) dt} \quad (3.54)$$

Um die erhaltenen VZVs zu charakterisieren, werden häufig Momente der Verteilung verwendet. Hierbei entspricht das erste Moment der mittleren Verweilzeit (vgl. Gleichung (3.51)):

$$\mu_1 = \int_0^\infty t \cdot E(t) dt = \bar{t} \quad (3.55)$$

Mit μ_1 als erstes Moment der Verteilung (in s) und \bar{t} als mittlere Zeit, die ein Fluidelement im Reaktor verweilt (in s).

Für kinetische Messungen sind enge VZV zu bevorzugen, da die Fluidelemente ähnliche Zeit im Reaktor verbleiben und so die Reaktionszeit vergleichbar ist.

3.3.2 Reynolds-Zahl

Direkten Einfluss auf die VZV hat das Strömungsprofil des Fluids im Reaktor. Grob wird zwischen laminaren und turbulenten Strömungen unterschieden, wobei sich turbulente Strömungen unter anderem durch starke Vermischungen auszeichnen [143]. Abbildung 3.9 skizziert ein laminares und ein turbulentes Strömungsprofil in radialer Richtung. Durch ein laminares Profil ist ein starker Gradient der Strömungsgeschwindigkeit in radialer Richtung vorhanden, wodurch einige Fluidelemente das System deutlich schneller verlassen als andere Elemente, welche am Rand strömen.

Um verschiedene Strömungen zu charakterisieren und in laminar und turbulent einzuteilen kann die Reynolds-Zahl verwendet werden. Diese wird über die Geometrie des Reaktors, die Strömung und Stoffeigenschaften des Fluids berechnet [143].

$$\text{Re} = \frac{d_{\text{Rea}} \cdot w \cdot \delta}{\eta} \quad (3.56)$$

3 Theorie

Mit Re als Reynolds-Zahl (dimensionslos), d_{Rea} als Reaktordurchmesser (in s), δ als Dichte des Fluids (in kg/m^3). (In Anhang B ist eine Auswahl an verschiedenen Werten für die Viskosität von Wasser (auch bei verschiedenen Drücken) aufgelistet.)

Dabei ist die kritische Reynolds-Zahl als der Zahlenwert definiert, an welchem die Strömung von laminar zur turbulent umschlägt [144]. Bei Leerrohren ist die kritische Reynoldaszahl als 2300 bestimmt [145].

3.3.3 Bernoulli-Gleichung

Laut der Stromfadentheorie ist die Energie eines Fluidelementes, welches sich entlang der Strömung bewegt, konstant [143]. Es werden die Komponenten Geschwindigkeit, Höhe und Druck berücksichtigt.

Mittels einer Energiebilanz um die Pumpe kann der spezifische Leistungseintrag berechnet werden, welcher benötigt wird, um den Druck von Umgebungsdruck auf Hochdruck zu erhöhen:

$$\frac{w_1^2}{2} + \frac{p_1}{\delta_1} + g \cdot h_1 + \tilde{P}_P = \frac{w_2^2}{2} + \frac{p_2}{\delta_2} + g \cdot h_2 \quad (3.57)$$

Mit \tilde{P}_P als spezifische Pumpenergie (in J/kg), g als Gravitationsbeschleunigung (in m/m^2) und h als Höhe (in m). Da sich weder die Höhe (potentielle Energie) noch die Strömungsgeschwindigkeit (kinetische Energie) ändert, ist der massenspezifische Leistungseintrag durch die Pumpe proportional zur Druckänderung:

$$\tilde{P}_P = \frac{p_2 - p_1}{\delta} \quad (3.58)$$

Mit dem Massenstrom kann die benötigte Pumpleistung berechnet werden:

$$P_P = \tilde{P}_P \cdot \dot{m} = \Delta p \cdot \dot{V} \quad (3.59)$$

Mit P_P als Pumpleistung (in W), \dot{m} als Massenstrom (in kg/s) und Δp als Druckdifferenz (in Pa).

3.4 Rührkessel / Umlaufreaktor

Rührkesselreaktoren (auch Satzreaktoren) stellen einen der Standardreaktoren dar (siehe Abschnitt 1.1.3). Dabei ist es gängig anzunehmen, dass das Medium homogen durchmischt ist [109]. Ein Rührkesselreaktor besitzt weder einen Ein- noch einen Ausgang. Nicht ideale Rührkessel können anhand des Mischungsverhaltens charakterisiert werden. Hier wird, ähnlich wie bei der Bestimmung der VZV, ein Zielstoff zugegeben und die Änderung der Konzentration des Zielstoffes an einem Messpunkt im Reaktor aufgezeichnet [110].

$$h_m(t) = \frac{c(t) - c_0}{c_\infty - c_0} = \frac{S_M - S_{M,0}}{S_{M,\infty} - S_{M,0}} \quad (3.60)$$

Mit h_m als Homogenitätsgrad der Mischung (dimensionslos).

Eine Angabe der Mischzeit kann die Dauer sein, bis der Homogenitätsgrad 0,9 erreicht hat.

Umlaufreaktoren sind ähnlich zu Satzreaktoren, da kein Ein- oder Ausgang existiert und das Fluid nicht ideal durchmischt ist.

3.5 Druckeinfluss auf Reaktionen, Enzyme und andere physikalische Größen

Dieser Abschnitt behandelt die Einflüsse von Druck auf verschiedene Aspekte, welche die Synthese von Neu5Ac beeinflussen. Die Abhängigkeit des thermodynamischen Gleichgewichts vom Druck bildet die Grundlage zur Beschreibung des Einflusses von Druck auf die Reaktionskinetik. Aus diesem Grund wird mit der Wirkung von Druck auf das thermodynamische Gleichgewicht begonnen.

3.5.1 Thermodynamisches Gleichgewicht

Bereits 1887 wurde von Planck in seiner Abhandlung „Ueber das Princip der Vermehrung der Entropie“ hergeleitet, dass die Gleichgewichtskonstante einer Reaktion mit der freien Gibbs-Energie zusammenhängt (Gleichung (3.61)) [76].

$$RT \ln(K_a) = -\Delta_R G \quad (3.61)$$

Hierbei ist $\Delta_R G$ der Unterschied der Gibbs-Energie zwischen Substrat und Produkt (in J/mol). Die Änderung der Gibbs-Energie ($\Delta_R G$) hängt unter anderem von dem Druck des Systems ab. In aktueller Literatur wird die Herleitung von Gleichung (3.61) über chemische Potentiale durchgeführt [7–9].

Exemplarisch sei hier die Veröffentlichung von Sander von 1943 angeführt, welche für die Isomerisierung von α -Glucose zu β -Glucose die Lage des Gleichgewichts in Abhängigkeit vom Druck beschreibt [146].

Der Einfluss von Druck wird in der Literatur häufig mit Hilfe der Ableitung angegeben [77, 147]. Zum Beispiel bei der Untersuchung von Enzymen [70, 83] oder Bakterien aus der Tiefsee [79].

$$RT \frac{\partial \ln K_a}{\partial p} = -\Delta V \quad (3.62)$$

Variationen von Gleichung (3.62) wurden aufgestellt, um Änderungen des molaren Volumens wiederzugeben. So verwenden Marshall und Mesmer [148] die von El'yanov-Hamann [149] bestimmte Gleichung:

$$\ln \frac{K(p)}{K_0} = -\frac{\Delta V}{RT} \cdot \frac{p}{1 + b_p \cdot p} \quad (3.63)$$

Mit b_p als Parameter zur Anpassung (in 1/Pa).

Vila-Real und Mitarbeiter [73] verwenden Ansätze verschiedener Autoren [150, 151]:

$$\ln K = A + B \cdot p + C \cdot p^2 \quad (3.64)$$

3 Theorie

Mit A (dimensionslos), B (in 1/Pa) und C (in 1/Pa²) als Anpassungsparameter oder Gleichung (3.65).

$$\ln K = \frac{A + B \cdot p}{1 + C_2 \cdot p} \quad (3.65)$$

Mit C_2 als Anpassungsfaktor (in 1/Pa).

Hill und Root geben Gleichung (3.61) vollständig nach K aufgelöst an [8]. In dieser Arbeit wird dieser Ansatz übernommen, wobei Parameter, welche in die Gibbs-Energie eingerechnet werden und unabhängig vom Druck sind (zum Beispiel die Temperatur), in eine Gleichgewichtskonstante bei Referenzdruck K_0 zusammengefasst werden.

$$K(p) = K_0 \cdot e^{-\frac{\Delta V}{RT}p} \quad (3.66)$$

Mit K_0 als Gleichgewichtskonstante bei Referenzdruck (0 Pa) (verschiedene Einheiten).

Nach Denbigh ist Gleichung (3.66) für die verschiedenen Gleichgewichtskonstanten (K_a , K_m , K_c) gültig [134]. Nachfolgend wird die konzentrationsbasierte Gleichgewichtskonstante verwendet.

Mit Gleichung (3.66) ist der Zusammenhang von der Gleichgewichtskonstanten und dem Druck gegeben. Damit kann in Gleichung (3.33) auch die Volumenänderung sowie Lage des Gleichgewichts bei dem Referenzzustand und der Druck berücksichtigt werden. Der folgende Ausdruck beschreibt damit die Abhängigkeit des Gleichgewichtsumsatzes einer 2-zu-1-Reaktion zu dem Druck und den thermodynamischen Parametern ΔV und K_0 .

$$X_{GGW}(p, \Delta V, K_0, \alpha, c_{S1,0}) = \frac{1 + \alpha + \frac{\exp(\frac{\pm \Delta V}{RT}p)}{c_{S1,0}K_0}}{2} - \sqrt{\left(\frac{1 + \alpha + \frac{\exp(\frac{\pm \Delta V}{RT}p)}{c_{S1,0}K_0}}{2}\right)^2 - \alpha} \quad (3.67)$$

Gleichung (3.67) wurde graphisch von Bruins und Mitarbeitern aufgetragen ohne explizit die Gleichung anzugeben [77]. Bruins und Mitarbeiter gingen dabei davon aus, dass die Substrate äquimolar vorliegen ($\alpha = 1$).

3.5.2 Kinetik

Die bereits in Abschnitt 1.1 eingeführte Eyring-Gleichung bildet den Einfluss des Drucks auf Geschwindigkeitskonstanten und damit auch die Reaktionsrate ab. Hierfür wurde angenommen, dass das Edukt im chemischen Gleichgewicht mit einem Übergangszustand ist [65, 66]. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion ist dabei proportional zu der Gleichgewichtskonstante zwischen Edukt und Übergangszustand:

$$k = \zeta \cdot K^\ddagger \frac{k_B T}{\hbar} \quad (3.68)$$

Hierbei steht ζ für den Transmissionskoeffizienten (dimensionslos), die Beschreibung \ddagger verdeutlicht, dass es sich um das Gleichgewicht zwischen Edukt und Übergangszustand handelt, und \hbar die Planck-Konstante (6,6260... Js). Da die Geschwindigkeitskonstante

3.5 Druckeinfluss auf Reaktionen, Enzyme und andere physikalische Größen

proportional zu der Gleichgewichtskonstanten ist, wurde die Abhängigkeiten vom Druck (Gleichung (3.62)) in die Beschreibung der Kinetik integriert.

Somit ergibt sich die Eyring-Gleichung zu:

$$k(p) = k_0 \cdot e^{-\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} p} \quad (3.69)$$

Die Gleichung wurde sowohl in der chemischen Reaktionstechnik [8], als auch in der Biotechnologie zitiert [68]. Mit dem Einfluss des Drucks auf die Geschwindigkeitskonstanten, haben Hamajima und Mitarbeiter den Einfluss von Druck auf die maximale Reaktionsrate (v_{max}) übertragen [152].

Aufgrund der Herleitung mittels der Gleichgewichtskonstante sind Variationen der Eyring-Gleichung nach Gleichung (3.64) verwendet worden. So haben Walling und Tanner Polynome höheren Grades verwendet um die Abhängigkeit abzubilden [153].

Shkolnikov und Mitarbeiter haben gezeigt, dass die Änderung der Geschwindigkeitskonstante keinem exponentiellem Verlauf folgen muss [67]. Bei der Zersetzung von Polyphenolen sinkt die Geschwindigkeitskonstante zwischen 0,1 MPa bis 150 MPa von 0,002 1/s auf 0,001 1/s und steigt dann bei 200 MPa wieder auf den Wert bei Umgebungsdruck (0,002 1/s) an.

3.5.3 Einfluss auf den pH-Wert

Da der pH-Wert Einfluss auf die Enzymaktivität hat [41], muss ein etwaiger Einfluss von Druck untersucht werden. Laut Samuelsen und Mitarbeitern ist dieser Änderung bei Drücken bis 100 MPa vernachlässigbar und oberhalb dieses Druck ca. 0,5 [154]. Samaranyake und Sastry haben eine Reduktion des pH-Werts um 0,5 für destilliertes Wasser bis 800 MPa festgestellt [155].

Raghuraman und Mitarbeiter haben eine Änderung von 0,1 des pH-Werts bis 60 MPa festgestellt [156]. Quinlan und Reinhart haben verschiedene 100 mM Phosphat-Pufferlösungen auf Änderungen im pH-Wert analysiert [157]. Hier sank der pH-Wert von Kaliumphosphatpuffer um bis zu $4 \cdot 10^{-3}$ 1/MPa. Dieses Ergebnis stimmt mit der Aussage von Samuelsen und Mitarbeitern überein, dass die Änderung ca. $5 \cdot 10^{-3}$ 1/MPa beträgt.

Kobayashi und Mitarbeiter haben eine Reduktion des pH um 0,3 für eine Maillard-Reaktion in Wasser festgestellt [158].

Nach Kragl ist die Abhängigkeit der Enzymkinetik von dem pH-Wert in dem Bereich 7,0 bis 8,0 für die Aldolase und 6,5 bis 8,0 für die Epimerase nicht stark ausgeprägt [41].

Um einer potentiellen Reduktion des pH-Wertes durch Druck vorzubeugen, wird in dieser Arbeit ein pH-Wert zwischen 7,5 und 8,0 verwendet. Die Verwendung von Bereichen, in denen die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig vom pH-Wert ist, wurde bereits von Andersen und Grønlund für die Mutarotation von Glucose verwendet um indirekte Einflüsse vom Druck auszuschließen [92].

3.5.4 Dichte und Viskosität

Die Reaktionsrate hängt nicht nur von der Geschwindigkeitskonstanten ab, wie sie durch die Eyring-Gleichung beschrieben wird, sondern auch von den Konzentrationen der

Tabelle 3.1: Stoffwerte für die Dichte von Wasser nach VDI [90] und IAPWS [91]

T [°C]	p [MPa]	δ [kg/m ³]	Quelle
25	0,1	997,1	VDI
25	20,0	1 005,8	VDI
25	100,0	1 037,9	VDI
50	0,1	988,1	VDI
50	100,0	1 027,4	VDI
30	0,1	996,6	IAPWS
30	20,0	1 005,3	IAPWS

Reaktanten. Wasser gilt im Allgemeinen als inkompressibel, was bedeutet, dass die Dichte nicht durch Druck beeinflusst wird. Dies wird aus den Daten für die Dichte bei verschiedenen Temperaturen und Drücken deutlich (Tabelle 3.1).

Da die Stoffmenge (n) nicht vom Druck beeinflusst wird, ist somit auch die Konzentration nicht signifikant beeinflusst. Hier sei erwähnt, dass im Rahmen der Tiefseeforschung verschiedene Modelle existieren, welche die Dichte des Wassers in Abhängigkeit des Drucks, dem Salzgehalt und der Temperatur berechnen [159, 160]. Die Internationale Vereinigung für die Eigenschaften von Wasser und Dampf (IAPWS) gibt in einer Tabelle die berechneten Dichten von Wasser an. Laut Wagner und Pruß ist die Berechnung von IAPWS sehr genau (<0,0001 %) [161]. Aus Tabelle 3.1 geht hervor, dass die Änderung der Dichte aufgrund von Druck kleiner als 4 % ist. Aus diesem Grund wird die Dichte (und somit auch die Konzentration) als unabhängig vom Druck angenommen.

Weiterhin kann die Viskosität einer Flüssigkeit durch Druck beeinflusst werden. Barus hat 1893 einen schwachen linearen Zusammenhang zwischen Viskosität und Druck (bis 200 MPa) festgestellt [162]:

$$\eta(p) = \eta(0) \cdot (1 + 0,0057 \cdot p) \quad (3.70)$$

Spätere Veröffentlichungen verwenden einen exponentiellen Zusammenhang bis 1 000 MPa [163]:

$$\eta(p) = \eta(0) e^{\xi_A \cdot p} \quad (3.71)$$

Mit ξ_A als Faktor (in 1/Pa).

Butz und Mitarbeiter stellen einen Geschwindigkeitsausdruck auf, welche Viskositätsänderungen durch den Druck berücksichtigen.

$$k(p) = k_0 \cdot \left(\frac{\eta(p)}{\eta_0} \right)^{\xi_B} e^{-\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} p} \quad (3.72)$$

Mit ξ_B als Anpassungsfaktor (dimensionslos). Bis 250 MPa sei die Änderung jedoch vernachlässigbar [72].

3.6 Druckverlust

Verschiedene Bauteile weisen einen Druckverlust auf, wenn diese durchströmt werden. In dieser Arbeit werden folgende Bauteile verwendet: der Festbettreaktor, Kapillaren und ein Rückdruckregler. Hoher Druckverlust gilt im Allgemeinen als Nachteil, welcher durch Reibung zwischen Fluid und Bauteil hervorgerufen wird [143]. Im Falle von hohem Druckverlust muss die Pumpe mehr Leistung aufnehmen um das Medium durch die entsprechenden Bauteile zu fördern.

3.6.1 Festbetten

Der Druckverlust in Festbettreaktoren wird durch die Ergun-Gleichung beschrieben.

$$\frac{dp}{dL} = e_1 \underbrace{\frac{(1 - \nu_f)^2}{\nu_f^3} \nu \cdot S_O^2 \cdot w}_{\text{laminar}} + \frac{e_2}{8} \underbrace{\frac{1 - \nu_f}{\nu_f^3} \delta \cdot w^2 \cdot S_O}_{\text{turbulent}} \quad (3.73)$$

Mit dp/dL als Druckverlust (in Pa/m), e_1 und e_2 als Korrekturterme (dimensionslos), ν als kinematische Viskosität (in m^2/s) und S_O als spezifische Oberfläche der Partikel im Festbett (in $1/\text{m}$). Die Ergun-Gleichung wurde 1949 angeführt [164], hat sich über die Jahre bewährt [165] und wird auch heute im VDI-Wärmeatlas verwendet [136]. Hierbei beschreibt erste Summand (w) den Druckverlust aufgrund der Viskosität und der zweite Summand (w^2) den Druckverlust aufgrund von Turbulenzen. Ist ein System streng laminar, überwiegt der erste Summand deutlich und der zweite Summand kann vernachlässigt werden.

Sofern das Fluid inkompressibel ist, ist w konstant und der Druck sinkt linear über die Länge des Reaktors (sofern die Viskosität unabhängig vom Druck ist).

3.6.2 Kapillaren

Zur Bestimmung des Druckverlustes in Kapillaren verwendeten Hagen und Poiseuille die Reibung an der Mantelfläche, wobei eine laminare Strömung vorausgesetzt wurde [143].

$$\frac{dp}{dL} = \dot{V} \frac{8 \eta}{\pi r^4} \quad (3.74)$$

Mit r als innerer Radius der Kapillare (in m).

In Gleichung (3.74) wird deutlich, dass der Druckverlust über eine Kapillare sehr sensitiv zum Innenradius ($\Delta p \propto r^{-4}$) ist und nur linear mit der Länge der Kapillare zunimmt.

3.6.3 Rückdruckregler

Anders als bei Festbetten und Kapillaren ist der Druckverlust bei Rückdruckreglern (RDR) nicht aufgrund von Reibungseffekten hervorgerufen und zudem meistens gewünscht, um einen definierten Druck im System zu erhalten.

3 Theorie

Das Arbeitsprinzip vieler RDR für kontinuierliche Flüsse ist, dass das eintretende Fluid auf eine bewegliche Öffnung trifft. Dies kann eine Membran oder eine Kugel sein, welche mit einem gewählten Setzdruck p gehalten werden. Erst, wenn der Druck des Fluids diesen Druck überschreitet, gibt die Membran nach und das Fluid kann durch die Öffnung strömen. Je nach Bauweise des RDR wird der Setzdruck pneumatisch, hydrostatisch oder mechanisch aufgebaut.

Der Einsatzbereich hängt hierbei hauptsächlich vom Druck, dem Volumenstrom sowie der Dichte des Fluids ab und wird mit dem K_V -Wert charakterisiert (nach DIN EN 60534-1) [166].

$$K_V = \dot{V} [m^3/h] \sqrt{\frac{0,1 \text{ MPa}}{p} \cdot \frac{\delta}{1000 \text{ kg/m}^3}} \quad (3.75)$$

4 Ergebnisse

Um den Einfluss von Hochdruck auf das Reaktionssystem zu untersuchen, wurde zunächst ein experimenteller Aufbau entwickelt. Für diesen wurden verschiedene Optionen verglichen und bewertet. Um verlässliche Ergebnisse der thermodynamischen und kinetischen Untersuchungen zu gewähren musste der realisierte Aufbau charakterisiert werden. Dies umfasst zum Beispiel die Stabilität des Drucks, die Verweilzeitverteilung und die Qualität der Mischkammer.

Mit diesen Kenntnissen konnten grundlegende Analysen des Enzymsystems durchgeführt werden.

Anschließend wurde der Einfluss von Druck auf die Reaktion untersucht. Mit dem Hochdruckreaktor wurden zunächst beide Reaktionen einzeln analysiert und anschließend die gesamte Reaktionssequenz umgesetzt. Die Ergebnisse der gekoppelten Reaktion wurden mit denen der Einzelreaktionen mittels kinetischer Simulationen und Berechnungen des Gleichgewichts verglichen.

Einige Anmerkungen zu den Angaben und berechneten Größen:

- Bei Druck werden der Median und die durchschnittliche Abweichung zum Median (MAD) angegeben.
- Bei Messwerten angegebene Fehler sowie die Fehlerfortpflanzung sind nach DIN 1319 berechnet (Anhang C.1) berechnet.
- Sämtliche aus Regressionsrechnungen erhaltene Werte werden mit einer Sicherheit von 95% angegeben. Dies umfasst die Unsicherheit der berechneten Regressionsparameter und die Breite des Vertrauensbereichs.

4.1 Entwicklung des Hochdruckreaktors

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Verwendung und den Effekten von Hochdruck liegt, war der Druckaufbau für die kontinuierliche Synthese essentiell. Kontinuierliche Reaktoren sind typischerweise Strömungsrohre, Membranreaktoren oder kontinuierlich arbeitende Rührkesselreaktoren [116]. Der Membranreaktor hält die Enzyme mit einer Membran zurück, welche für die Anwendung dieser Arbeit druckstabil sein müsste. Ein kontinuierlich arbeitender Rührkessel müsste um die Welle des Rührorgans vollständig abgedichtet sein. Im Vergleich zu diesen Herausforderungen bietet das Strömungsrohr den Vorteil, lediglich eine Pumpe zu benötigen, welche Hochdruck erzeugen kann. Zwar fällt der Druck über die Länge des Festbetts ab (Gleichung (3.73)), dieser Druckverlust ist im Vergleich zu dem zu untersuchendem Druckregime vernachlässigbar.

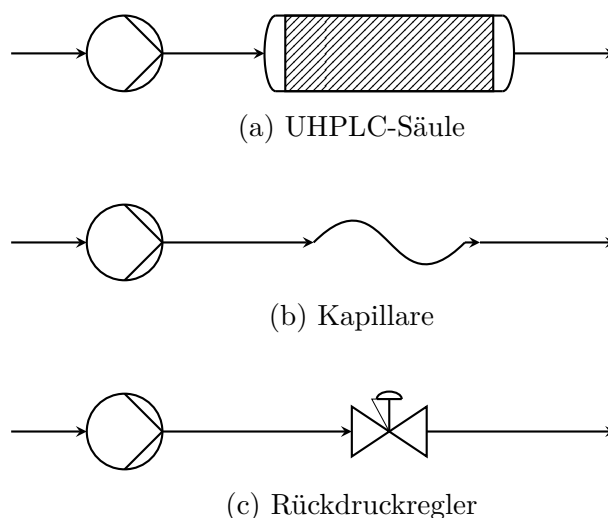


Abbildung 4.1: Fließbilder zur Untersuchung der Druckverluste verschiedener Bauteile. Bei diesen Versuchen wurden ausschließlich die zu untersuchenden Bauteile eingebaut. Die geschwungene Linie stellt hierbei eine Kapillare mit kleinem Querschnitt (maximal $50\ \mu\text{m}$) dar. Der Druck wurde durch einen internen Sensor der UHPLC-Pumpe aufgezeichnet.

Für den Druck im Reaktor ist der Druck am Ausgang des Reaktors maßgeblich. Mittels geeigneter Bauteile wurde ein Staudruck erzeugt, wodurch der Druck am Ausgang (und damit auch im Reaktor) stieg. Für den Druckaufbau wurden drei Optionen realisiert, untersucht und bewertet. Als Pumpe wurden verschiedene Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC)-Pumpen, sowie industrielle Pumpen und Spritzenpumpen in Betracht gezogen. Aufgrund des Druckbereiches (bis $130\ \text{MPa}$) und, vom Hersteller angegebenen, niedrigen Druckschwankung, wurde die Nexera X2-UHPLC-Pumpe (einschließlich Degaser und Mischkammer) von Shimadzu (Hannover, Deutschland) gewählt. Zudem kann die vom Hersteller eingebaute Mischkammer verwendet werden, um Konzentrationen im Reaktionsmedium zu verändern. Dies wurde für die Vermessung der Reaktionskinetik verwendet um die Substratkonzentrationen zu variieren.

Durch den Einsatz eines Festbettreaktors war der Aufbau flexibel und konnte angepasst werden, womit verschiedene Betriebsmodi ermöglicht wurden.

Zunächst wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, um einen Druck von $130\ \text{MPa}$ zu generieren. Dabei wurde ausschließlich die UHPLC-Pumpe und das zu untersuchende Bauteil verwendet (Abbildung 4.1).

4.1.1 Druckaufbau Variante 1: UHPLC-Säule

Aus der UHPLC-Analytik ist bekannt, dass feine Partikel zu hohen Druckverlusten führen [167]. Für diese Arbeit wurde dieser Druckverlust ausgenutzt. In UHPLC-Säulen werden Partikel mit einem Durchmesser $<2\ \mu\text{m}$ verwendet [168, 169] und je nach Material und Länge der Säule, sowie Eluentstrom Drücke über $100\ \text{MPa}$ erreicht. In diesem Fall wurde die UHPLC-Säule „Ultra BiPh $5\ \mu\text{m}$ “ von Restek (Bad Homburg v.d.H., Deutschland)

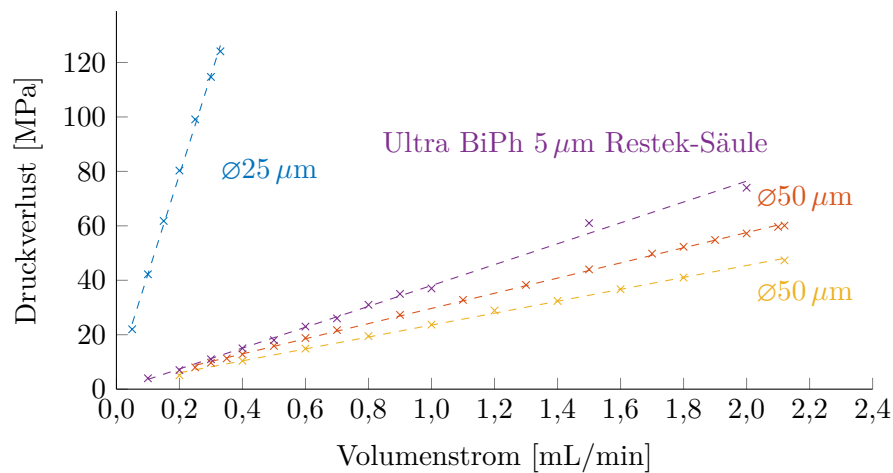


Abbildung 4.2: Gemessener Druckverlust von verschiedenen Kapillaren mit Länge 30 cm sowie der UHPLC-Säule von Restek. Gefördert wurde hochreines Wasser (maximal $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$) bei Raumtemperatur.

eingesetzt (die $5 \mu\text{m}$ beschreibt den Partikeldurchmesser der Packung) und der Volumenstrom variiert (Abbildung 4.2). Der Druckverlust stieg in dem untersuchten Bereich linear mit dem Volumenstrom bis 74 MPa.

4.1.2 Druckaufbau Variante 2: Kapillaren

Durch die Reibung zwischen Fluid und Wand kommt es zum Druckverlust (vergleiche Abschnitt 3.6.2). Da der Druckverlust sensitiver gegenüber dem Radius als der Länge der Kapillare ist ($\Delta p \propto r^{-4}$ und $\Delta p \propto L$), wurden Kapillaren verschiedener Innendurchmesser genutzt. In Abbildung 4.2 wurde der Druckverlust von Kapillaren mit einem Innendurchmesser von $25 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$ aufgezeigt (Hersteller VICI (Houston, Vereinigte Staaten von Amerika), vertrieben durch Machery-Nagel (Düren, Deutschland)). Die Länge sämtlicher Kapillaren betrug 30 cm. Nicht gezeigt sind die Ergebnisse von Kapillaren mit $100 \mu\text{m}$ Innendurchmesser, da der Druckverlust 1 MPa betrug und für diese Arbeit damit nicht relevant war. Da Gleichung (3.74) einen linearen Zusammenhang zwischen Volumenstrom und Druckverlust beschreibt, wurde eine Regressionsgerade für die gemessenen Werte verwendet.

4.1.3 Druckaufbau Variante 3: Rückdruckregler

Im Gegensatz zu Reibungskräften wird der Druck bei Rückdruckreglern (RDR) durch einen Gegendruck an einer Membran erzeugt. Dadurch ist dieser unabhängig von der Flussrate und kann gegebenenfalls dynamisch verändert werden. Der Gegendruck kann entweder durch ein weiteres Fluid oder durch eine Feder erzeugt werden. Die Verwendung von RDRs bei der Untersuchung von Enzymen wurde bereits in der Literatur beschrieben [170]. RDRs sind in der Lage den geforderten Druckbereich abzudecken (0 MPa bis 130 MPa),

4 Ergebnisse

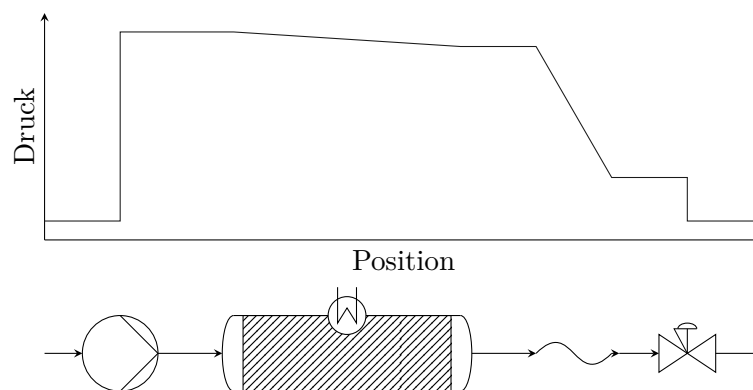


Abbildung 4.3: Festbettreaktor und schematischer Verlauf des Drucks über die Länge. Druckverlauf über das Festbett betrug maximal 8 MPa, Druckverlust am RDR bis zu 30 MPa und bis zu 110 MPa über die Kapillaren.

stellen jedoch eine große Investition dar. Der für diese Arbeit gewählte RDR (Hersteller: VICI) deckt 0 MPa bis 30 MPa ab und wird mechanisch eingestellt.

4.1.4 System der Wahl

Da die gewählte Pumpe Drücke bis 130 MPa erzeugen kann, fiel die Wahl zum Druckaufbau auf die Kapillaren, da diese zum einen ein geringeres Innenvolumen als die UHPLC-Säule aufweisen und zum anderen der Druckverlust unter der Hälfte von 130 MPa lag. Hierdurch war es möglich zwei Kapillaren (Innendurchmesser (ID) $50\ \mu\text{m}$) in Reihe geschaltet zu verwenden, um den maximalen Druck zu erreichen. Der Druck konnte anschließend mittels des RDR justiert werden (Anforderung 1)

Der resultierende Aufbau ist in Abbildung 4.3 gezeigt. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Anfangsgeschwindigkeit-Methode verwendet und Volumenströme bis 2 mL/min eingesetzt. Die Reynolds-Zahlen für die verschiedenen Elemente sind in Tabelle B.1 zu finden.

Der kleinste, zur Verfügung stehende Reaktor besitzt ein (Leer-) Volumen von 0,21 mL (ISERA GmbH (Düren, Deutschland)) (Radius 0,15 cm, Länge 3 cm), womit die Verweilzeit 6,3 s beträgt. Dabei ist das Volumen, welches das Fluid einnimmt, kleiner als 0,21 mL und somit die Verweilzeit reduziert sein, wenn Enzym-Träger-Präparate verwendet werden. Da das Reaktionssystem von anderen Arbeitsgruppen im Stundenmaßstab verwendet wird (vergleiche Abschnitt 1.1.1), war Anforderung 3 erfüllt.

Der Reaktor wurde mittels eines Säulenofens von SYKAM (Eresing, Deutschland) temperiert.

In einem anfänglichen Versuch wurde der Druckverlust im Reaktor bis zu 8 MPa bestimmt. Dieser Wert wurde durch Verwendung von zerkleinerten Epimerase-Träger-Partikeln in einem 10 cm langen Reaktor (Radius 0,15 cm) bei einem Volumenstrom von 2 mL/min gemessen. Aufgrund des langen Reaktors, hohen Volumenstroms und zerkleinerten Partikeln stellten 8 MPa die obere Grenze dar, da keine längeren Reaktoren

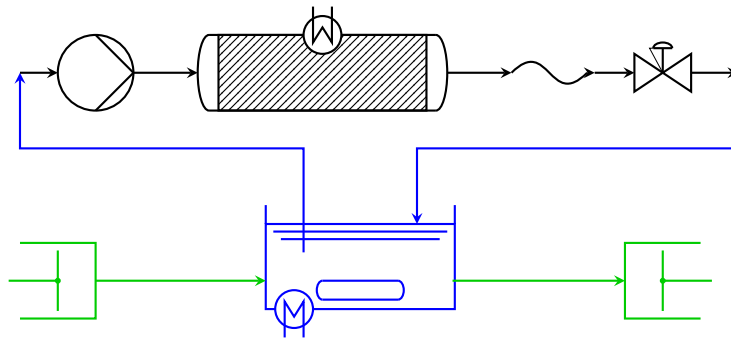


Abbildung 4.4: Drei verschiedene Betriebsmodi des Hochdruck-Festbettreaktors: Als normaler Festbettreaktor zur Vermessung der Kinetik (schwarz), als Umlaufreaktor zur Vermessung des Gleichgewichts (+blau) und als kontinuierlich arbeitender Umlaufreaktor (+grün).

oder höheren Volumenströme verwendet wurden. Andere verwendete Reaktoren besaßen eine Länge von 3 cm oder 5 cm. Aus diesem Grund wurde die Änderung des Drucks über die Länge des Reaktors vernachlässigt.

Wenn die Lage des Reaktionsgleichgewichts bestimmt werden soll, sind hohe Verweilzeiten nötig, welche deutlich niedrigere Flussraten bedeuten (0,07 mL/min für eine Verweilzeit von 10 min, sofern ein größerer Reaktor mit einem Reaktorvolumen von 0,7 mL verwendet würde). Da bei diesen Flussraten der Druckverlust zu niedrig wäre, wurde der kontinuierlich arbeitende Festbettreaktor zu einem Umlaufreaktor umgebaut indem der Ausgang und Zulauf verbunden wurden (schwarze und blaue Zeichnung in Abbildung 4.4).

Makroskopisch wurde hierdurch ein Verhalten ähnlich zu einem Satzreaktor erreicht und es konnte die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts bestimmt werden. (Ein essentieller Unterschied ist jedoch die konvektive Strömung um den Katalysator, welcher bei einem Satzreaktor nicht zwangsläufig gegeben ist.) Das Reaktionsmedium wurde mit ein Wasserbad von Jalabo (Seelbach, Deutschland) temperiert und mittels eines Magnetrührers von IKAMAG (Staufen, Deutschland) durchmischt.

Laut Groisman und Gedanken [171] sowie Wang und Mitarbeitern [172] sind Umlaufreaktoren vielseitig einsetzbar. Lindeque und Woodley beschrieben in einer Literaturübersicht zu Festbettreaktoren auch die Möglichkeit eines vollständigen Recyclingstroms [109]. In dieser Arbeit zeigte der Hochdruckumlaufreaktor folgende Vorteile:

- Die Flussrate konnte frei gewählt werden.
- Der Druck konnte mittels des RDR während der Experimente verändert werden.
- Bei stärkeren Druckvariationen konnte der Druck geändert werden, indem Kapillaren entfernt oder hinzugefügt wurden.
- Probenentnahme waren aus dem Pufferbehälter bei Umgebungsdruck möglich und es besteht die Möglichkeit von Online-Analytik ohne Hochdruckausrüstung.

4 Ergebnisse

Da Hochdruckreaktoren häufig geschlossene Systeme sind (siehe Abschnitt 1.1.2), erwies sich besonders der letzte Punkt als Vorteil. Echtzeitanalytik für Hochdruckreaktoren wurde bereits 1972 als Herausforderung gesehen [80].

Da der Umlaufreaktor keinen kontinuierlichen Produktstrom besitzt, wurden zwei Spritzenpumpen (in Abbildung 4.4 grün gezeichnet) von WORLD PRECISION INSTRUMENTS (Friedberg, Deutschland) verwendet um Reaktionslösung in, beziehungsweise aus dem temperierbaren Pufferbehälter zu fördern. (Die Temperatur im Pufferbehälter wurde mit dem Wasserbad MA-4 von Julabo (Seelbach, Deutschland) geregelt.) Hiermit wurde ein Verhalten ähnlich zu einem kontinuierlich arbeitendem Rührkesselreaktor erhalten. Dabei ist entscheidend, dass der Volumenstrom des im Kreis geförderten Fluids deutlich größer ist als der Volumenstrom, welcher in das System ein- beziehungsweise ausgetragen wird. Mit dieser Modifikation konnte ein Betriebspunkt erreicht werden, welcher hohen Druck bei beliebigen Verweilzeiten ermöglichte.

4.2 Charakterisierung des Aufbaus

Verschiedene Aspekte des Aufbaus, welche für aussagekräftige Ergebnisse essentiell sind, wurden untersucht. Um zu prüfen, ob der gewählte Aufbau die Anforderung erfüllt, dass der Druck im Reaktor konstant ist (Anforderung 2), wurde der Druck aufgezeichnet und analysiert. Zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Konzentrationsänderung durch die mittlere Verweilzeit der Reaktanten geteilt. Die mittlere Verweilzeit wurde mittels der Verweilzeitverteilung bestimmt. Des Weiteren wurde die Verweilzeitverteilung des gesamten Aufbaus gemessen, um zu gewährleisten, dass sich das System im stationärem Betriebspunkt befand. Zudem wurde überprüft ob die Mischkammer für kinetische Experimente geeignet ist. Schließlich wurde die Mischzeit des Umlaufreaktors vermessen.

4.2.1 Druckschwankungen

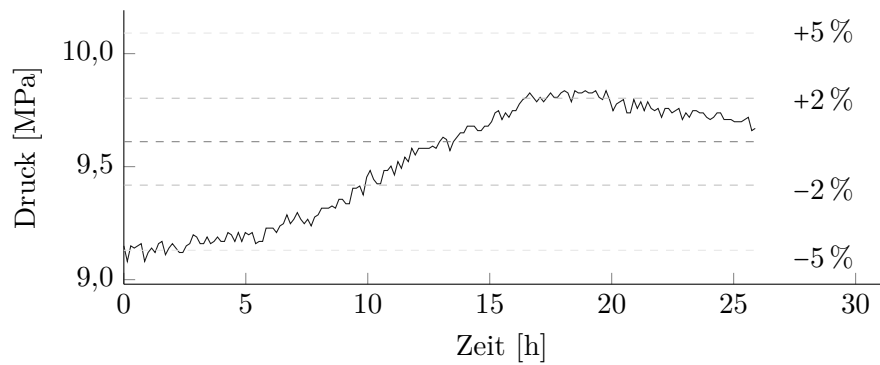
Die Stärke der Druckschwankungen wurde bei verschiedenen Drücken (um 10 MPa und um 100 MPa) untersucht (Abbildung 4.5). Um die Schwankungen zu klassifizieren wurde die durchschnittliche Abweichung zum Median-Wert (MAD) mittels des MATLAB[®]-Befehls `mad(x,1)` berechnet. Zudem wurden Fehlerintervalle von $\pm 2\%$ und $\pm 5\%$ eingezeichnet.

Sämtliche gemessenen Drücke befanden sich in dem Bereich von $\pm 5\%$ um den Medianwert. Bei Umgebungsdruck ist die relative Abweichung häufiger größer als $\pm 2\%$ als bei dem Versuch mit Hochdruck. Da die absolute Druckschwankung weniger als $\pm 0,5$ MPa betrug, wurde diese Schwankung vernachlässigt. Median und MAD betragen $(9,6 \pm 0,2)$ MPa und $(103,5 \pm 0,9)$ MPa, welche die Bewertung einer geringen Druckschwankung bestärken.

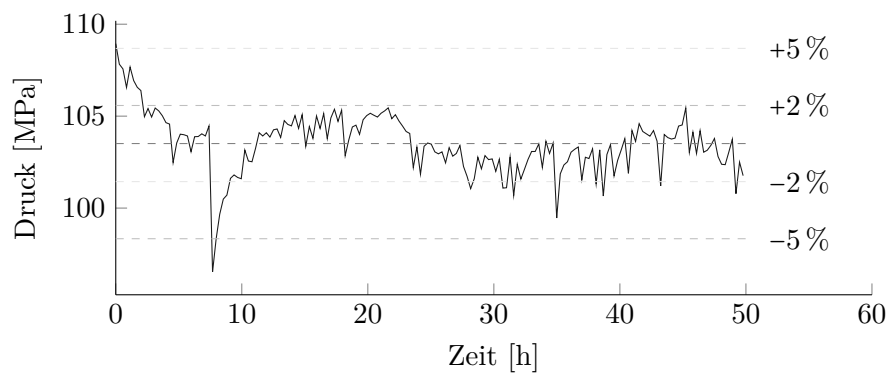
Somit wurde Anforderung 2 erfüllt.

In Abbildung 4.5a ist ein Trend des Drucks mit der Zeit zu erkennen. Dieser Trend erstreckte sich über einen Zeitraum von 20 h. Da es sich hierbei um $0,035$ MPa/h handelte und das thermodynamische Gleichgewicht in wenigen Stunden erreicht werden sollte,

4.2 Charakterisierung des Aufbaus



(a) Niedrigdruck



(b) Hochdruck

Abbildung 4.5: Verlauf des Drucks. Die Flussrate betrug 2 mL/min bei 40 °C. Gefördert wurden 100 mM KP_i -Puffer mit 300 mM *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) und Pyruvat (Pyr).

wurde dieser Anstieg vernachlässigt. (Bei Versuchen mit dem Aldolase-Träger-Präparat befand sich das Reaktionsmedium nach maximal drei Stunden im Gleichgewicht.)

4.2.2 Verweilzeitverteilung des Festbett-Reaktors

Für die Bestimmung der Reaktionsrate wird die Verweilzeit (τ) benötigt (Gleichung (4.1)).

$$v = \frac{dc}{dt} \approx \frac{\Delta c}{\tau} = \frac{\Delta c \cdot \dot{V}}{V_{Fluid}} \quad (4.1)$$

Mit Δc als Konzentrationsdifferenz (in mol/m³).

Diese wurde mittels der Verweilzeitverteilung (VZV) bestimmt. Wird die VZV nicht berücksichtigt, kann dies zu erheblichen Unterschieden zwischen Modellrechnung und Realität führen [8].

Aus der VZV wurde zudem die Schüttungsdichte berechnet und so die Vergleichbarkeit verschiedener gepackter Festbetten sichergestellt.

Die VZV wurde berechnet, indem ein Reaktor (Leervolumen 0,21 mL) anstelle der Trennsäule in eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) eingebaut wurde. Dabei war der Reaktor mit mittels Mörser zerkleinertem Enzym-Träger-Präparat befüllt und das HPLC-System mit 5 mM H₂SO₄-Lösung als Laufmittel verwendet. Als Zielstoff wurde eine 10 mM KP_i-Pufferlösung mit einem Dirac-Puls injiziert (1 μ L bzw. 5 μ L mit 1 mL/min).

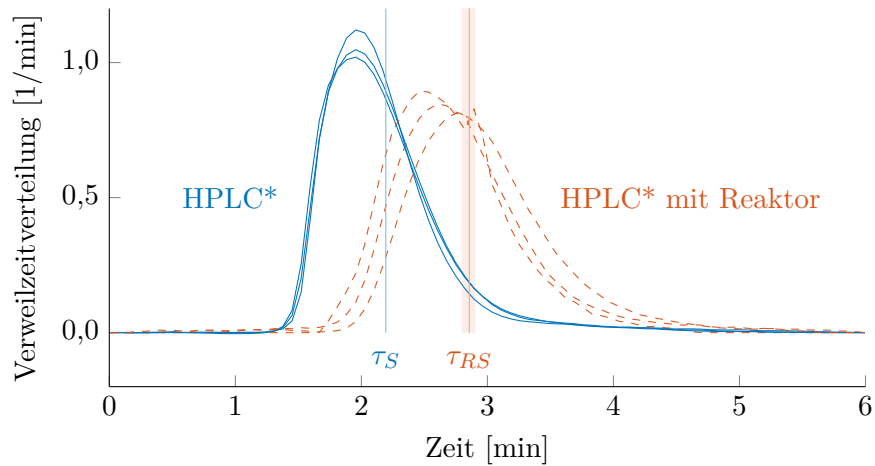
Da die VZV mithilfe der Geräte einer HPLC vermessen wurde, ist in Abbildung 4.6a sowohl die VZV des reinen Messsystems (HPLC) als auch die VZV des Systems mit dem eingebauten Reaktor dargestellt. Bei allen Messungen wurde die Chromatographie-Säule der HPLC ausgebaut. Somit bestand der apparative Aufbau aus der HPLC-Pumpe, dem automatischen Probennehmer sowie dem Berechnungsindexdetektor (RID) (zuzüglich Kapillaren).

Die Verweilzeitverteilungen wiesen eine vergleichbare Form auf und waren lediglich zeitlich verschoben. Hieraus wurde geschlossen, dass die VZV des Reaktors sehr schmal ist und der Mittelwert der Reaktorverteilung die zeitliche Differenz der Verteilungen bildet. Die mittlere Verweilzeit des Messsystems betrug (2,191 \pm 0,006) min während die des Messsystems mit dem Festbett zu (2,86 \pm 0,05) min bestimmt wurde (gemessen wurden Triplikate). Die zeitliche Differenz und damit die mittlere Verweilzeit des Festbetts wurde zu (0,66 \pm 0,05) min berechnet.

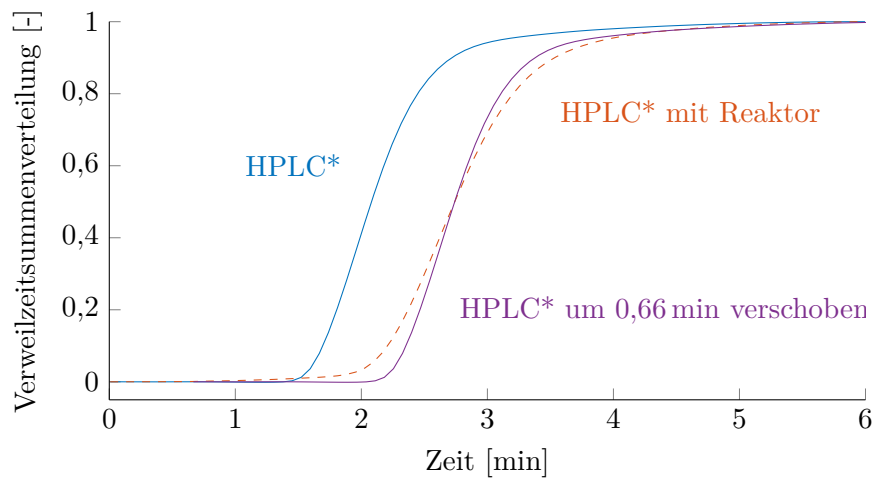
Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde die VZV des Messsystems um 0,66 min verschoben (Abbildung 4.6b). Da die verschobene Verteilung ähnlich zu der Verteilung von dem Messsystem mit Reaktor war, wurde die Annahme als bestätigt angenommen. Da die VZV des Reaktors damit sehr schmal war, bedeutet dies, dass die Strömung im Reaktor turbulent war.

Um das Volumen der Flüssigphase im Reaktor zu berechnen, wurde die vermessene Verweilzeit verwendet.

$$\tau = \frac{V_{Fluid}}{\dot{V}} = \frac{\nu_f \cdot V_{Rea}}{\dot{V}} = 0,66 \text{ min} \quad (4.2)$$



(a) Verweilzeitverteilung



(b) Summenverteilung

Abbildung 4.6: Gemessene Verweilzeitverteilungen von dem HPLC*-System (ohne Trennsäule) und dem System mit eingebautem Reaktor (gefüllt mit gemörserten Epimerase-Präparat (57,0 mg) und einem Leervolumen von 0,21 mL). Die berechnete Messunsicherheit ist durch die Breite der Fläche angedeutet. Flussrate: 0,21 mL/min, Injektionsvolumen 1 μ L und Injektionsgeschwindigkeit 1 mL/min.

$$\nu_f = \tau \cdot \frac{\dot{V}}{V_{Rea}} = 0,66 \text{ min} \cdot \frac{0,21 \text{ mL/min}}{0,21 \text{ mL}} = 0,66 \quad (4.3)$$

Somit wurde für sämtliche folgenden Auswertungen die Reaktionsrate wie folgt berechnet:

$$v = \frac{\Delta c}{\bar{t}} = \frac{\Delta c}{\tau} = \frac{1}{0,66} \cdot \frac{\Delta c}{V_{Rea}/\dot{V}} \quad (4.4)$$

4.2.3 Totzeit des Aufbaus

Um die Totzeit des gesamten experimentellen Aufbaus zu ermitteln, wurde das System als Festbett-Reaktor aufgebaut. Der Aufbau enthielt den Festbettreaktor, zwei $50 \mu\text{m}$ und eine $25 \mu\text{m}$ -Kapillare sowie den RDR. Über Vermessung des Spülvorgangs des gesamten Aufbaus wurde die Zeit bestimmt, nach welcher sich das System vollständig gespült ist.

Zur Vermessung wurde zunächst hochreines Wasser (maximal $0,055 \mu\text{S/cm}$) gefördert und nach Erreichen eines stationären Betriebspunktes auf 100 mM KP_i -Puffer umgeschaltet. Die Zeit, bis das Signal am UV-Detektor (UVD) eine Änderung detektierte, wurde als Totzeit des Aufbaus definiert. Sobald das Messsignal wieder konstant war, konnte das System als vollständig mit neuem Medium gespült betrachtet werden. Für eine Probenentnahme muss mindestens diese Zeit verstrichen sein, um Proben zu erhalten, aus welchem Aussagen abgeleitet werden können.

Vermessen wurde die benötigte Zeit sowohl für das Ändern von hochreinem Wasser zu KP_i -Puffer, als auch von KP_i -Puffer zu hochreinem Wasser (maximal $0,055 \mu\text{S/cm}$) (jeweils doppelt).

Wurde von hochreinem Wasser zu KP_i -Puffer gespült, waren die Signale sehr ähnlich. Als von diesem Zustand wieder mit hochreinem Wasser gespült wurde, zeigte sich eine Abweichung in den Signalen.

Um die Aussagekraft der Ergebnisse auch auf andere Volumenströme übertragen zu können, wurde die Zeit mit dem verwendeten Volumenstrom verrechnet um das geförderte Volumen an neuem Medium zu erhalten.

Aus dem Ergebnis von Abbildung 4.7 folgt, dass mindestens $1,5 \text{ mL}$ gefördert werden sollten, damit das System komplett gespült ist. Betrug die Flussrate zum Beispiel 2 mL/min , wurde mindestens 1 min gewartet, bis eine Probe entnommen wurde. Damit das System den stationären Betriebspunkt erreicht, wurden anschließend zusätzlich fünf Verweilzeiten gewartet.

Die Versuchsreihe wurde mit einem Volumenstrom von $0,1767 \text{ mL/min}$ durchgeführt. Wenn in Versuchen höhere Flussraten verwendet werden, ist die Strömung im System turbulenter und die VZV schmaler (vergleiche Abschnitt 3.3.2). Aus diesem Grund wurden die hier getroffenen Aussagen auch auf höhere Volumenströme übertragen.

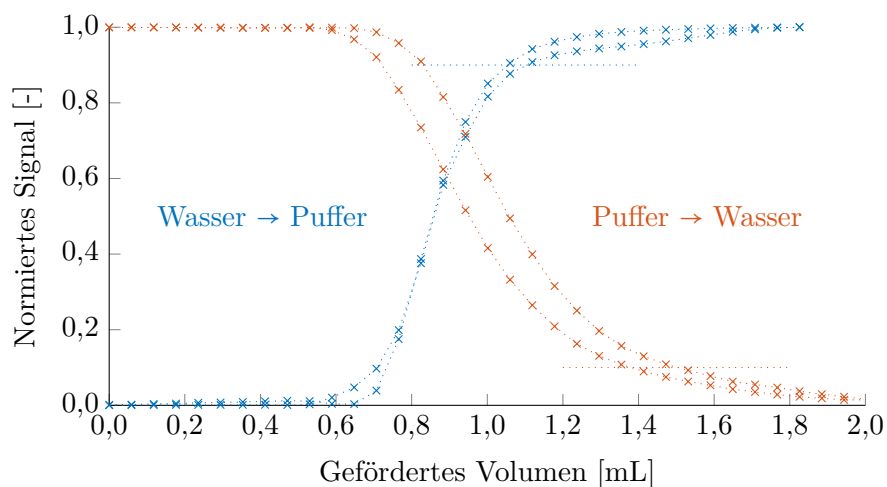


Abbildung 4.7: Gemessene Signale (Wellenlänge 200 nm) nach bestimmter Zeit / gefördertes Volumen. Die Flussrate betrug 0,1767 mL/min. Blaue Werte: Gefördert wurde zunächst hochreines Wasser (maximal $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$) (auch als Referenzpunkt). Anschließend wurde auf 100 mM KP_i -Puffer umgeschaltet. Orange: Reihenfolge war umgekehrt. Verwendet wurden 2 mal $50 \mu\text{m}$ und einmal eine $25 \mu\text{m}$ -Kapillare sowie der RDR. Messwerte sind zur visuellen Hilfe verbunden.

4.2.4 Genauigkeit der Mischkammer

Um die Kinetik im Festbettreaktor zu vermessen, wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Bei diesen Messreihen werden die Konzentrationen relevanter Komponenten (Substrat, Produkt und Inhibitor) variiert. Diese Variationen sollten mit der in der UHPLC-Pumpe eingebauten Mischkammer erreicht werden, indem Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen über die Eingänge der Mischkammer mit unterschiedlichen Verhältnissen gefördert wurden.

Die Qualität der Mischkammer wurden in zwei Aspekten untersucht: Um Pulsation auszuschließen (beziehungsweise die Homogenität des Mediums sicherzustellen) wurde die produzierte Mischung über einen längeren Zeitraum kontinuierlich überwacht. Anschließend wurden die Anteile der verschiedenen eingehenden Laufmittel variiert und die entstehenden Konzentrationen mittels HPLC vermessen und verglichen.

Um die Pulsation/Homogenität der Mischung zu bewerten wurde ein UVD verwendet

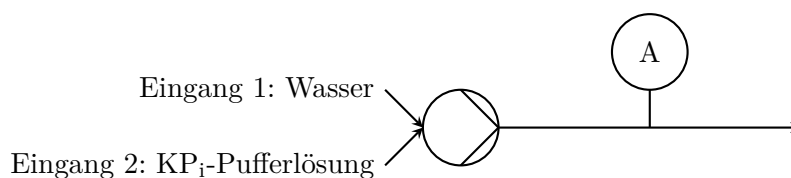


Abbildung 4.8: Aufbau zur Vermessung der Pulsation der Mischkammer. Es wurde ausschließlich die Mischkammer der UHPLC-Pumpe, die Pumpe und der UVD verwendet.

4 Ergebnisse

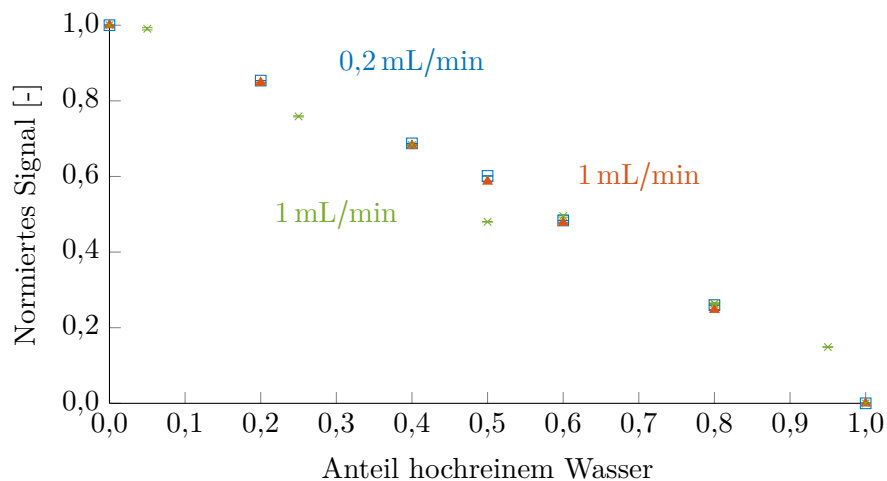


Abbildung 4.9: Normiertes Signal der Mischkammer gegen den Anteil von Laufmittel 1 (Wasser) Flussraten: 0,2 mL/min und 1 mL/min (zweifach vermessen). Laufmittel 2: 10 mM KP_i -Puffer. Fehlerbalken zeigt die Schwankung des Signals auf.

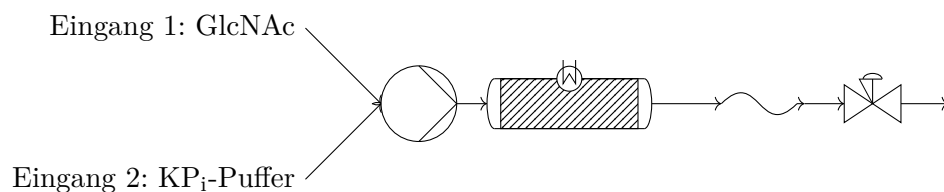


Abbildung 4.10: Fließbild bei der Verwendung der Mischkammer. Durch das Verändern der Anteile von Laufmittel 1 und 2 werden verschiedene Konzentrationen an GlcNAc erreicht. Im Zulauf war 50 mM GlcNAc bzw. 100 mM KP_i -Puffer. Die GlcNAc-Lösung in Eingang 1 wurde in der selben Pufferlösung angesetzt, sodass die Konzentration konstant 100 mM KP_i -Puffer betrug.

(siehe Abbildung 4.8). Dieser wurde einer Probenentnahme und anschließender Analyse mittels HPLC vorgezogen, da der UVD eine Messfrequenz von 21/s besaß. Hierdurch konnte überprüft werden, ob die Mischkammer die eingehenden Fluide homogenisierte oder periodisch zwischen ihnen umschaltete. Ein Umschalten wäre durch Signalsprünge im UVD-Signal aufgefallen. Die Schwankungen der Signale waren deutlich kleiner als der absolute Wert des Signals, was aus den Fehlerbalken aus Abbildung 4.9 hervorgeht. Aus diesem Grund wurde gefolgert, dass die Mischung homogen war.

Zudem wurde festgestellt, dass bei einem Volumenstrom von 1 mL/min die Reaktionszeit des Sensors maximal 90 s (entspricht 1,5 mL gefördert) betrug, welches konsistent mit dem Ergebnis in Abschnitt 4.2.3 war.

Nach erfolgreicher Feststellung der Homogenität wurden die absoluten Konzentrationen sowohl bei Niedrig-, als auch bei Hochdruck vermessen. Dabei war der Aufbau wie in Abbildung 4.10 dargestellt. Mit der Mischkammer wurde eine 50 mM GlcNAc-Lösung in

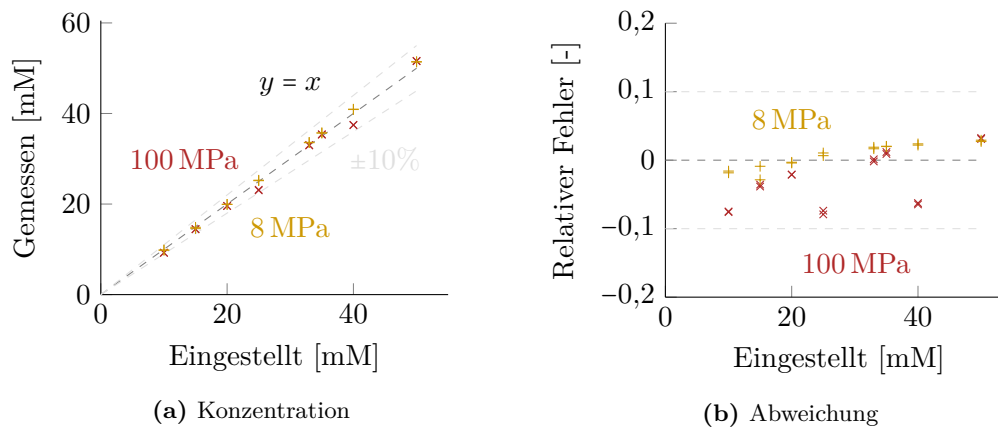


Abbildung 4.11: Eingestellte und gemessene Reaktantenkonzentration (Summe der Substrat- und Produktkonzentration). Zulauf: 50 mM GlcNAc gepumpt mit 1,8 mL/min, es wurden 2,25 min gewartet bis die erste Probe entnommen wurde. Hochdruckbereich (90 MPa bis 102 MPa), Niederdruckbereich (7,5 MPa bis 8 MPa)

verschiedenen Verhältnissen gemischt mit einer 100 mM KP_i -Pufferlösung vermischt. Die mittels HPLC bestimmten Konzentrationen sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Sämtliche Konzentrationen waren innerhalb des 10 %-Toleranzbereiches.

Somit wurde zum einen eine hohe Homogenität der Mischung, zum anderen eine hohe Genauigkeit bei dem Verhältnis der verschiedenen gepumpten Lösungen gemessen. Aus diesem Grund wurde der Einsatz der Mischkammer für Vermessungen der Reaktionskinetik als geeignet bewertet.

4.2.5 Umlaufreaktor: Mischzeit und Reaktionsvolumen

Um die Homogenität des Reaktionsmediums im Umlaufreaktor zu untersuchen, wurde die Mischzeit bestimmt. Durch die Untersuchung der Mischzeit können auch zeitliche Änderungen detektiert und gegebenenfalls aufgelöst werden. Wenn die Zeit zwischen den entnommenen Proben deutlich größer als die Mischzeit war, wurde davon ausgegangen, dass die entnommene Probe repräsentativ für das gesamte Medium im Aufbau war.

Zur Vermessung der Mischzeit wurde der Umlauf wie in Abbildung 4.12 um einen UVD erweitert.

Da die Durchmischung unter anderem von der Viskosität abhängt, wurde die Mischzeit sowohl mit hochreinem Wasser und 20 mM KP_i -Puffer (Abbildung 4.13), als auch mit einer 400 mM GlcNAc-Lösung (Abbildung 4.14) durchgeführt, um eine Viskosität ähnlich zu verschiedenen Reaktionsmedien nachzustellen. Zudem wurde das Volumen in dem Pufferbehälter variiert, um zu untersuchen, ob das Verhältnis von diesem Volumen zum Volumen des restlichen Aufbaus die Mischzeit beeinflusst.

Wie Abbildung 4.13 zeigt, war das Mischverhalten bei den untersuchten Volumina im Pufferbehälter ähnlich. Daraus wurde geschlossen, dass die Mischung im Behälter selbst

4 Ergebnisse

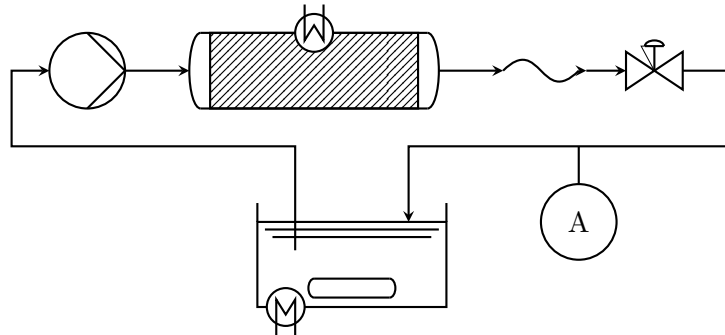


Abbildung 4.12: Experimenteller Aufbau zur Bestimmung der Mischzeit im Umlaufreaktor. Bauteile von oben links im Uhrzeigersinn: UHPLC-Pumpe, Festbettreaktor (temperiert), Kapillare mit $50\ \mu\text{m}$ Innendurchmesser, RDR, UVD, Pufferbehälter mit Magnetrührer (temperiert).

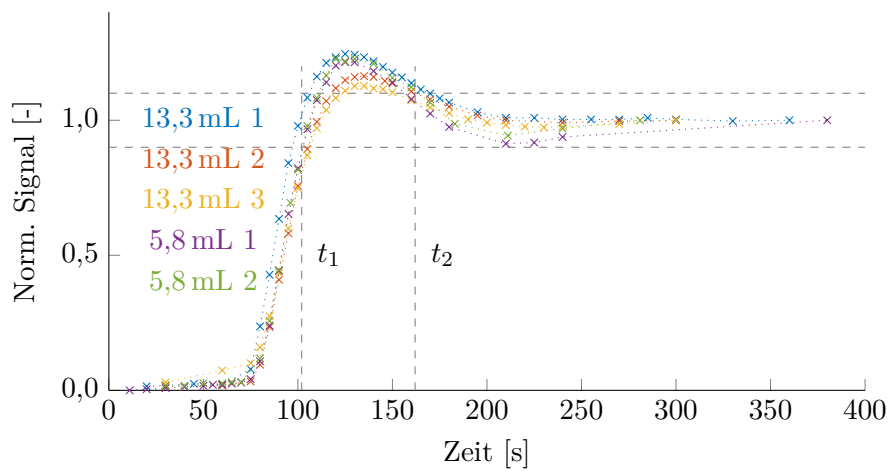


Abbildung 4.13: Vermessenes normiertes Signal über die Zeit. Zu 13,3 mL hochreinem Wasser im Behälter wurden 3 mal 1 mL 20 mM KP_i -Puffer zugegeben. Zudem wurden zu 5,8 mL hochreinem Wasser 2 mal 0,5 mL 20 mM KP_i -Puffer zugegeben. Förderrate der UHPLC-Pumpe: 2 mL/min.

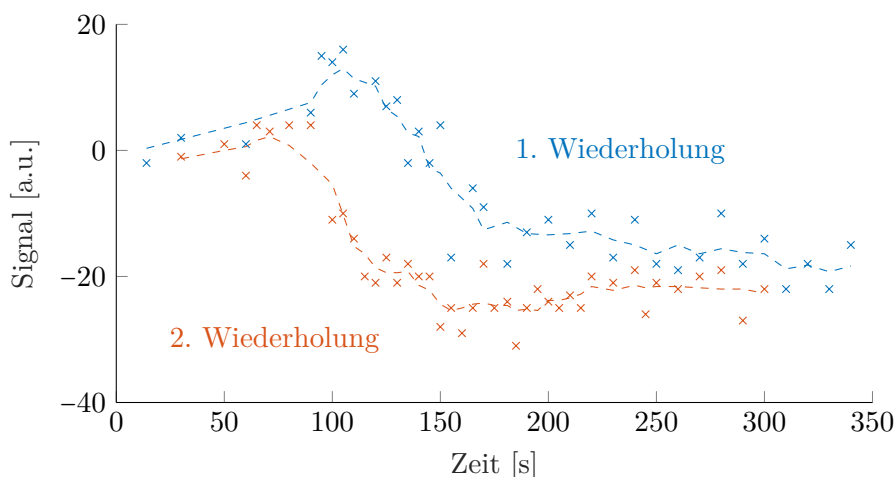


Abbildung 4.14: 400 mM GlcNAc mit 1 mL 50 mM KP_1 -Puffer versetzt. Signal nicht normiert, da zu hohes Rauschen. Die gestrichelte Linie ist der sich bewegende Durchschnitt aus fünf Nachbarn. Verwendete Wellenlänge: 200 nm bei 2 mL/min.

sehr schnell homogen war und Änderungen des Signals mit der Zeit durch das Volumen der Kapillaren, Mischkammer, Entgaser und Reaktor des Systems hervorgerufen wurden.

Aufgrund des Überschwingens des Signals wurden zwei Zeiten berechnet, welche das Mischverhalten charakterisieren. Die erste Zeit präsentiert den Zeitpunkt, ab welchem das Signal zum ersten Mal in das 10 %-ige Band um das finale Signal eintrat. Diese Zeit wurde zu 102 s berechnet. Die zweite Zeit wurde als der Wert bestimmt, ab welchem das Signal in das 10 %-ige Band eintrat und es nicht mehr verließ. Dieser Wert wurde als 162 s ermittelt. Zudem wurde festgestellt, dass die Zeit, bis Änderungen durch den Sensor detektiert wurden, 75 s betrug.

Da das UVD-Signal bei hoher GlcNAc-Konzentration an der Sättigungsgrenze und somit nicht mehr proportional zur Konzentration war, konnten hier nur qualitative Aussagen getroffen werden. Zudem wurde ein starkes Rauschen des Detektorsignals beobachtet, welches genaue Aussagen zusätzlich erschwerte. Es wurde ein bewegender Durchschnittswert aus fünf nächstgelegenen Werten berechnet um das Rauschen zu reduzieren (gestrichelte Linie in Abbildung 4.14). Wie zuvor festgestellt, trat die erste Änderungen des Signals zwischen 70 s bis 100 s auf und das Signal war ab 180 s war.

Zusätzlich zur Mischzeit wurde das Gesamtvolumen des Aufbaus ohne den Pufferbehälter bestimmt. Dieses Volumen bestand aus den Kapillaren zu der UHPLC-Pumpe, dem Degaser, der Mischkammer sowie den Kapillaren zum Druckaufbau und dem RDR. Es wurde zu 5 mL bestimmt. Von diesen 5 mL wurde der Großteil in den Kapillaren zur Pumpe, sowie dem Degaser und der Mischkammer ermittelt, da die restlichen Kapillaren und der RDR ein deutlich kleineres Volumen aufwiesen (z.B. $6 \cdot 10^{-6}$ mL in den Druckaufbau-Kapillaren). Somit war das Volumen des Aufbaus mit 5 mL konstant zwischen allen Versuchen.

4 Ergebnisse

Die zuvor bestimmten 5 mL Volumen waren konsistent mit den Ergebnissen in Abbildung 4.13. Da der Volumenstrom zu 2 mL/min eingestellt wurde und die Strömung in den Kapillaren laminar war, betrug die maximale Geschwindigkeit innerhalb des Systems das Doppelte der mittleren Geschwindigkeit [143]. Somit war zu erwarten, dass nach 1,25 min ($\frac{5 \text{ mL}}{4 \text{ mL/min}}$) die Konzentrationsänderung den Kapillarenausgang erreicht. Wie Abbildung 4.13 zeigt, war die Totzeit des Systems 75 s bis 80 s und somit konsistent zu dem bestimmten Gesamtvolumen des Systems.

4.3 Grundlegende Untersuchungen zu den Reaktionen

Um zu gewährleisten, dass gemessenen Effekte auf Änderungen in der Reaktionsrate zurückzuführen sind, wurden verschiedene Aspekte überprüft. Zum Beispiel musste sichergestellt sein, dass das Trägermaterial nicht durch Druck verändert wurden, da damit eine Variation der Porengrößen einhergehen würde. Außerdem mussten Diffusionslimitierungen (Film- und Porendiffusion) ausgeschlossen werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu der Reaktionskinetik zu erhalten.

Wie in der Einleitung geschrieben, wurden in sämtlichen Versuchen eine Epimerase (EC 5.1.3.8) aus *Pedobacter heparinus* und eine Aldolase (EC 4.1.3.3) aus *Escherichia coli* K12 verwendet.

4.3.1 Stabilität des Trägermaterials

Um ein geeignetes Trägermaterial für die Immobilisate auszuwählen, wurde die Partikelgrößenverteilung von unbehandelten, in KP_i -Puffer gelagerten und druckbehandelten (80 MPa für 2,5 h) Purolite ECR 8204F-Partikeln mittels CamSizer XT von Retsch Technology GmbH (Haan, Deutschland) untersucht. Abbildung 4.15 zeigt die gemessenen Größenverteilungen mit den Regressionskurven (für die Regressionen wurden Gauß-Glocken angenommen). Die Mittelwerte der Verteilungen betragen $(208,6 \pm 1,6) \mu\text{m}$ für die unbehandelten, $(209,5 \pm 2,8) \mu\text{m}$ für die 24 h gelagerten und $(215,2 \pm 0,8) \mu\text{m}$ für die druckbehandelten Partikel. Da kein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten der unbehandelten und in KP_i -Puffer gelagerten Partikel festgestellt wurde, wurde ein Anschwellen der Partikel in der Lösung ausgeschlossen. Im Vergleich zu den unbehandelten Partikeln wiesen die in KP_i -Puffer gelagerten Partikel eine Zunahme von Partikeln mit einer Größe von mindestens $300 \mu\text{m}$ auf. Da die Lage und Form der Glockenkurven der unbehandelten und gelagerten Partikel ähnlich war, besteht die Möglichkeit, dass die Partikel im CamSizer XT nicht vollständig separiert und so Agglomerate gebildet wurden. Eine Erhöhung des Dispersionsdrucks im CamSizer XT könnte die Agglomerate trennen. Zudem könnten die aufgenommenen Bilder detailliert auf Agglomerate untersucht werden.

Wegen der ähnlichen Regressionskurven für die Verteilung wurden die Partikelpopulationen als ähnlich bewertet. Aus diesem Grund wurden im Folgenden die unbehandelten Partikel mit den druckbehandelten verglichen.

Die Medianwerte der Verteilungen betragen $210 \mu\text{m}$ (unbehandelt) und $216 \mu\text{m}$ (druckbehandelt). Mittels der MATLAB[®]-Funktion `ttest2` wurde die Null-Hypothese getestet,

4.3 Grundlegende Untersuchungen zu den Reaktionen

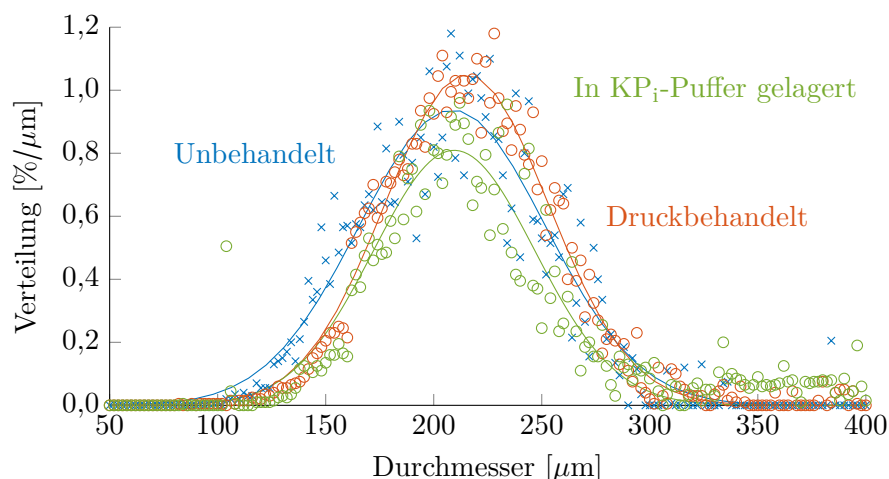


Abbildung 4.15: Aufgenommene Partikelgrößenverteilungen für Purolite ECR 8204F. Durchgezogene Linien stellen Regressionskurven dar, für welche eine Gaußsche-Glocke angenommen wurde. „Unbehandelte“ Partikel wurden direkt vermessen, „in KP_i -Puffer gelagerte“ wurden 24 h in 200 mM KP_i -Puffer gelagert und „druckbehandelte“ wurden für 2,5 h 80 MPa in einem Festbettreaktor unter Druck gesetzt.

ob beide Verteilungen Stichproben der selben Population darstellen. Diese These wurde durch `ttest2` widerlegt, was bedeutet, dass eine Änderung der Partikel stattgefunden hat. Da die Änderung im mittleren Durchmesser weniger als 3% betrug, wurden die Veränderungen für die Anwendung in dieser Arbeit als nicht signifikant eingestuft.

Zusätzliche Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie oder Transmissionselektronenmikroskopie könnten weitere Aufschlüsse über die äußere und innere Oberfläche der Träger geben [173].

4.3.2 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit mittels des Festbettreaktors

Da nur die Eingangs- und Austrittskonzentrationen vermessen werden konnten, konnte der Reaktionsfortschritt nicht innerhalb des Reaktors bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung der Reaktionskinetik die Methodik der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit verwendet. Hierfür war es essenziell, dass die sich Konzentrationen linear mit der Länge des Reaktors ändern, um die Reaktionsrate über die Konzentration am Ausgang des Reaktors bestimmen zu können (Abbildung 3.7).

Um zu überprüfen, ob die Konzentrationen linear über die Länge des Reaktors zu- oder abnehmen, wurde die Verweilzeit mittels der Flussrate variiert (1,5 mL/min bis 2 mL/min). Wenn der Reaktionsfortschritt entsprechend klein ist, müssen die Konzentrationen linear mit steigender Verweilzeit steigen oder fallen.

Da die spezifische Aktivität der Epimerase höher als die der Aldolase ist [24, 42], war es an dieser Stelle ausreichend die Epimerase zu untersuchen. Durch eine hohe

4 Ergebnisse

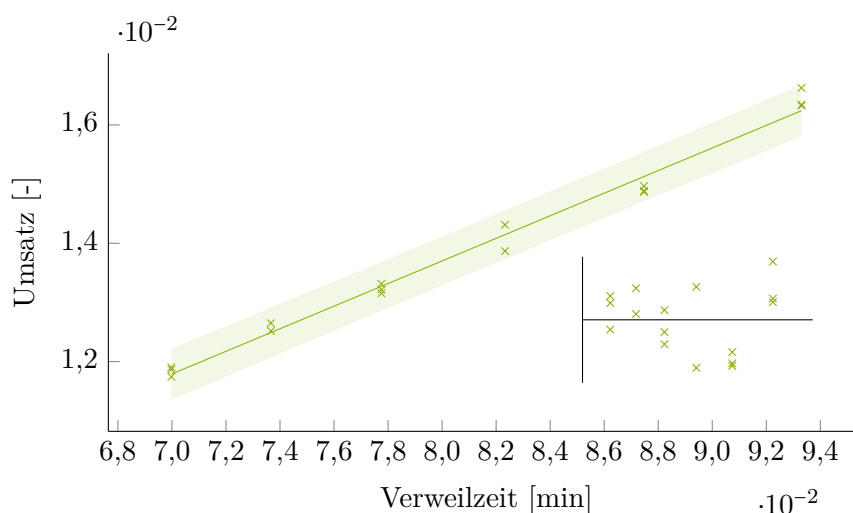


Abbildung 4.16: Umsatz bei verschiedenen Verweilzeiten. Verwendet wurde ein Reaktorvolumen von 0,21 mL. Erreicht durch Variation der Flussrate bei 1,6 MPa, GlcNAc 1000 mM, Temperatur 39 °C, 1 mM Adenosin triphosphat (ATP) und 1 mM MgCl_2 . 10 mM KP_i -Puffer (pH 7,50). 58,9 mg Epimerase-Träger-Präparat. Im 2. Achsensystem wurden die normierten Abweichungen der Messwerte von der linearen Regression eingetragen.

GlcNAc-Konzentration wurde zum einen die Reaktionsgeschwindigkeit maximiert und zu anderen signifikante Produktkonzentrationen bei kleinen Umsätzen erreicht.

In Abbildung 4.16 sind die gemessenen Umsätze aufgeführt. Diese waren stets kleiner als 1,7 %. Der Umsatz stieg linear mit der Verweilzeit. Zudem wurde eine lineare Regression verwendet um die Messpunkte abzubilden und die Abweichung der Messungen mit der Regression verglichen. Da die Abweichungen zufällig verteilt waren, war die lineare Regression und damit die Anwendung der Anfangsgeschwindigkeitsmessung geeignet.

4.3.3 Diffusionslimitierung

Um sowohl Film- als auch auf Porendiffusion auszuschließen, wurde die Epimerase verwendet, da die Reaktionsrate größer ist und es daher wahrscheinlicher ist, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Diffusion ist. Da GlcNAc und *N*-Acetyl-D-mannosamin (ManNAc) strukturell sehr ähnlich sind, wurde eine ähnliche Diffusionsrate angenommen.

Um zu prüfen, ob bei dem ersten Reaktionsschritt Filmdiffusion auftrat, wurden zwei Reaktoren unterschiedlicher Länge verwendet (3 cm und 5 cm). Die Flussrate wurde dabei variiert, sodass die Verweilzeit konstant gehalten wurde (0,4 mL/min und 0,666 mL/min). Die Substratlösung beinhaltete 180 mM GlcNAc, sowie 1 mM ATP und 1 mM MgCl_2 . In den Reaktoren befanden sich 42,3 mg (im 3 cm-Reaktor) sowie 110 mg (im 5 cm-Reaktor) Immobilisat. Zur Bewertung wurde die Konzentration von ManNAc verwendet, welche $(22,5 \pm 0,1)$ mM und $(22,6 \pm 0,1)$ mM betrug (gemessen in Triplikaten). Dies stellte einen Umsatz von jeweils 12,5 % dar. Sollte eine Limitierung durch Filmdiffusion vorhanden

4.3 Grundlegende Untersuchungen zu den Reaktionen

gewesen sein, wäre der Umsatz bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten höher, da die Grenzschichtdicke reduziert gewesen wäre. Da dies nicht der Fall war, wurde eine Filmdiffusionslimitierung ausgeschlossen.

Es fällt auf, dass, obwohl der zweite Reaktor „nur“ 66 % länger ist, mehr als das Doppelte an Immobilisat verwendet wurde. Somit ist die Konzentration des Immobilisates im 5 cm-Reaktor höher (314 g_{Tr}/L vergleichen mit 202 g_{Tr}/L). Aufgrund der erhöhten Enzymkonzentration wäre ein höherer Umsatz zu erwarten gewesen. Es wird vermutet, dass das Strömungsprofil in den beiden Reaktoren unterschiedlich war und der 5 cm-Reaktor ein höheres Totvolumen und somit eine geringere Verweilzeit aufwies.

Porendiffusion wurde überprüft, indem der 3 cm-Reaktor entleert und die Partikel zerkleinert wurden. Bei der Verwendung von gemörserten Partikeln betrug die Konzentration von ManNAc (31,1 ± 0,2) mM (der Umsatz betrug 17,2 %). Da diese deutlich höher als die mit den größeren Partikeln war, wurde davon ausgegangen, dass Porendiffusionslimitierung vorlag. Dies wurde weiter bestätigt, indem die Kinetik mit nicht behandelten und zerkleinerten Partikeln unter Hochdruck aufgenommen wurde (Abbildung 4.17). Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der spezifischen Aktivität. Zwar wurde auch die Flussrate und somit die Verweilzeit variiert, diese wurde jedoch um 11 % erhöht, während die gemessenen spezifischen Aktivitäten um einen Faktor von 1,5 variierten. Wäre die Reaktion nicht diffusionslimitiert und die Erhöhung der spezifischen Aktivität nur auf die reduzierte Flussrate zurückzuführen, wäre ein Faktor von 1,11 zu erwarten gewesen. Somit war eine Limitierung durch Porendiffusion wahrscheinlich und die Partikel wurden in allen folgenden Experimenten, sofern nicht anders angegeben, zerkleinert. Um Randgängigkeit in Festbettreaktoren vorzubeugen sollten die Durchmesser der Partikel deutlich kleiner als der Durchmesser des Reaktors sein [174].

Durch das Zerkleinern der Partikel mittels Mörser wurde auch die Oberfläche erhöht. Da die Epimerase vor der Zerkleinerung der Partikel immobilisiert wurden, konnten keine Enzyme an der neu generierten Oberfläche vorliegen. Aus diesem Grund ist die Erhöhung der vorhandenen Oberfläche für die Aktivität irrelevant und die Erhöhung der Aktivität muss durch Porendiffusion begründet werden.

4.3.4 Vermessung des Schmelzpunktes der Enzyme

Da einige Arbeitsgruppen von irreversiblen Effekte durch die Einwirkung von Druck auf Enzyme berichten [89], wurde der Schmelzpunkt als Maß für eine Strukturänderung untersucht. Dieser beschreibt die Temperatur, bei welcher die Hälfte der Enzyme in der nativen Struktur und die andere Hälfte entfaltet vorliegt [175].

Mit dem Messgerät Andromada von NanoTemper (München, Deutschland) werden Änderungen in der Fluoreszenz bei 670 nm detektiert.

Um von Druck verursachte, irreversible Änderungen in der Stabilität der Enzyme zu untersuchen, wurde der Schmelzpunkt ohne und mit Vorbehandlung durch Hochdruck verglichen. Die Vorbehandlung stellte dabei das Fördern der Enzymlösung (jeweils 10 mg/mL) durch den Aufbau ohne Reaktor dar (0,2 mL/min bei 115 MPa und Umgebungstemperatur). Dies bedeutete einen schnellen Druckanstieg innerhalb der Pumpe und anschließende graduelle Abnahme des Drucks über die verbauten Kapillaren. Aufgrund

4 Ergebnisse

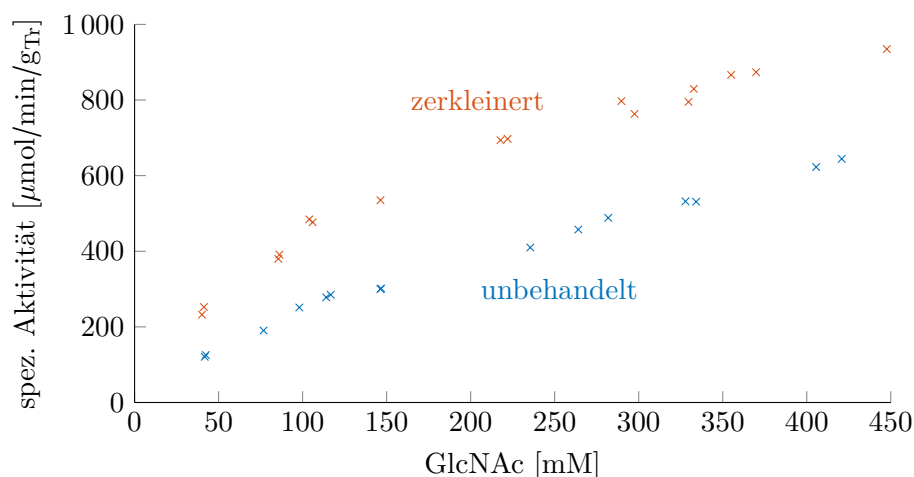


Abbildung 4.17: Aufgenommene spezifische Aktivität von unbehandeltem und zerkleinertem Epimerase-Immobilisat bei 115 MPa, verwendet wurde ein Reaktorvolumen von 0,21 mL. Temperatur 39 °C, 1 mM ATP und 1 mM MgCl₂. 10 mM KP_i-Puffer (pH 7,50). 58,9 mg unbehandeltes Epimerase-Träger-Präparat (mit 2 mL/min) und 55,0 mg mittels Mörser zerkleinertes Epimerase-Träger-Präparat (mit 1,8 mL/min).

Tabelle 4.1: Vermessene Schmelzpunkte [°C] der freien Enzyme ohne und mit Druckbehandlung. Durchgeführt wurde eine 4-fach-Bestimmung.

	Vorbehandlung	
	keine	Druck
Epimerase	58,40 ± 0,03	59,12 ± 0,05
Aldolase	88,17 ± 0,17	87,99 ± 0,20

des geringen Volumens, welches unter Hochdruck steht, wurde die Enzymlösung insgesamt weniger als 1 min druckbehandelt.

Gelagert wurden die Enzyme in 10 mM KP_i-Pufferlösung bei einem pH-Wert von 8,00.

Die Schmelzpunkte sind in Tabelle 4.1 festgehalten. Es wurde festgestellt, dass bei der Epimerase der Schmelzpunkt aufgrund des Drucks irreversibel um $(0,72 \pm 0,06)$ °C erhöht wurde. Aufgrund der 4-fach-Bestimmung wird dieser Effekt zwar als statistisch signifikant bewertet, stellt für die Reaktorführung aufgrund der geringen Erhöhung keine signifikante Verbesserung dar. Bei der Aldolase konnte keine Schmelzpunktverschiebung festgestellt werden.

Bei beiden Enzymen besteht die Möglichkeit, dass durch eine Verlängerung der Vorbehandlung stärkere Veränderungen im Schmelzpunkt erreicht werden.

4.4 Aldolase

Da die Gleichgewichtsverschiebung der Aldolase (2-zu-1-Reaktion) eine grundlegende Arbeitshypothese darstellte, wurde diese zuerst untersucht. Um den gefundenen Einfluss des Drucks auf die Lage des Gleichgewichts zu erklären, wurden anschließend die kinetischen Parameter unter Niedrigdruck und unter Hochdruck bestimmt. Abschließend wurde mittels der Haldane-Beziehung aus den bestimmten kinetischen Parametern die daraus resultierende Gleichgewichtskonstante berechnet und die Konsistenz zu der direkt vermessenen Gleichgewichtskonstanten geprüft.

4.4.1 Gleichgewicht

Als Maß für die Lage des Gleichgewichts wurde die Gleichgewichtskonstante und nicht der Gleichgewichtsumsatz verwendet, da der Gleichgewichtsumsatz von dem Substratverhältnis abhängt. Da die Gleichgewichtskonstante nur von der Temperatur, dem Druck und der Änderung der freien Gibbs-Energie abhängig ist, ist sie unabhängig von dem Substratverhältnis (Gleichung (3.61)).

Um die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts zu bestimmen, wurde der entwickelte Umlaufreaktor verwendet.

Eine vollständige Deaktivierung der Enzyme konnte ausgeschlossen werden, indem dasselbe Festbett für Versuche an verschiedenen Tagen verwendet wurde (Abbildung 4.18) und indem in einzelnen Versuchen der Druck direkt verändert wurde, nachdem das Gleichgewicht erreicht wurde.

Es konnte eine Erhöhung der Gleichgewichtskonstanten mit Druck erreicht werden (Abbildung 4.18). Diese Abhängigkeit wurde durch zwei unterschiedliche Methoden festgestellt: Zum einen wurden verschiedene Experimente bei jeweils einem konstanten Druck durchgeführt. Zum anderen wurde innerhalb eines Experiments der Druck nach Erreichen des Gleichgewichtes verändert, was zu einer direkten Änderung der Konzentrationen führte (angedeutet durch die Pfeile in Abbildung 4.18). Letzteres war in Übereinkunft mit dem Prinzip von Le Chatelier.

Die in Abbildung 4.18 verwendete Regressionsfunktion ist entsprechend Gleichung (3.66) ein exponentieller Zusammenhang zwischen der Gleichgewichtskonstanten und dem Druck.

Dass die Gleichgewichtskonstante mit dem Druck anstieg, bedeutete eine Reduktion des molaren Volumens zwischen ManNAc und Pyr im Vergleich zu *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Mittels der Regressionsfunktion (Gleichung (3.62)) wurde die Volumenänderung zu $(-16,0 \pm 1,2)$ mL/mol bestimmt. Die Gleichgewichtskonstante beim Referenzdruck wurde zu $(20,9 \pm 0,9)$ L/mol und bei Hochdruck zu $(43,9 \pm 3,0)$ L/mol berechnet. Da die Abweichungen der Messwerte und der Regressionsfunktion zufällig verteilt waren, wurde auf eine Übereinstimmung von Theorie und den gemessenen Werten geschlossen. Aus diesem Grund wurden Mischungseffekte, welche die Aktivitätskoeffizienten (γ_i) verändern, vernachlässigt. Somit wurde die Annahme, dass die Gleichgewichtskonstante durch die Verwendung von Konzentrationen berechnet werden konnte, bestätigt.

Einige Autoren verwenden erweiterte Gleichungen um die Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von Druck abzubilden [73, 78]. Hierbei wird angenommen, dass

4 Ergebnisse

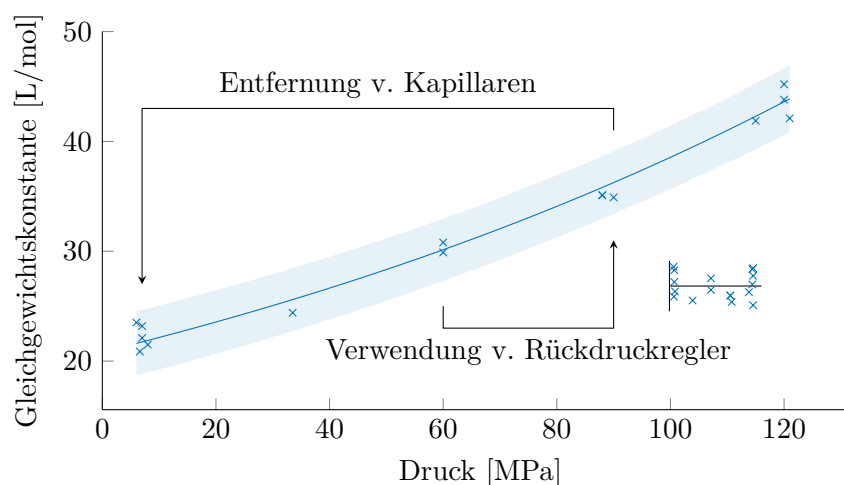


Abbildung 4.18: Änderung der Gleichgewichtskonstante mit dem Druck. Es wurden 100 mM ManNAc und 250 mM Pyr verwendet. Bei einem Versuch bei Niedrigdruck wurden 100 mM ManNAc und Pyr eingesetzt. Temperatur: 41 °C, Säule: 0,7 mL Innenvolumen, Flussrate: 1,5 mL/min und ein Volumen im Pufferbehälter von 2 mL (gewogen und mit Messzylinder), 272,3 mg Aldolase-Träger-Präparat. Die Pfeile zeigen an, wenn die Lage des Gleichgewichts mit dem selben Reaktor bei verschiedenen Drücken unmittelbar nacheinander bestimmt wurde. Im 2. Achsensystem ist jeweils der Arkustangens der normierten Fehler gegen den Druck aufgetragen.

Komponenten kompressibel sind und so das molare Volumen vom Druck abhängig ist. Da das verwendete Modell mit zwei Parametern den Verlauf der Messwerte wiedergab, wurde auf weitere Parameter verzichtet.

Die Größenordnung der Volumenänderung war vergleichbar mit anderen Reaktionen, welche in der Literatur beschrieben sind: Vila-Real und Mitarbeiter untersuchten die enzymatische Umsetzung von p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranose bis 200 MPa und stellten Volumenänderungen um 64 mL/mol fest [73]. Bruins und Mitarbeiter maßen eine Erhöhung des molaren Volumens von 2,4 mL/mol für die enzymatische Synthese von Oligosacchariden [77]. Die Entfaltung von Proteinen ist in der Größenordnung -100 mL/min [87].

Um weiter zu überprüfen, ob die berechnete Größenordnung realistisch ist, wurde als weiterer Vergleichswert das molare Volumen von Wasser berechnet. Das molare Volumen von Wasser beträgt bei Umgebungsbedingungen ca. 18 mL/mol.

Andersen und Grønlund verwendeten die Abschätzung von Le Noble, dass das molare Volumen je gebildeter atomarer Bindung um ca. -10 mL/mol geändert wird [92].

Da bei der industriellen Produktion der Umsatz ausschlaggebend ist, wurde im Folgenden der gemessene Umsatz mit dem Umsatz verglichen, welcher mittels Gleichung (3.67) und den thermodynamischen Parameter (K_0 und ΔV) berechnet wurde. Die in Abbildung 4.19 dargestellte Kurve ist die Auswertung von Gleichung (3.67) bei verschiedenen Drücken. Aufgrund der Übereinstimmung von den gemessenen Umsätzen und

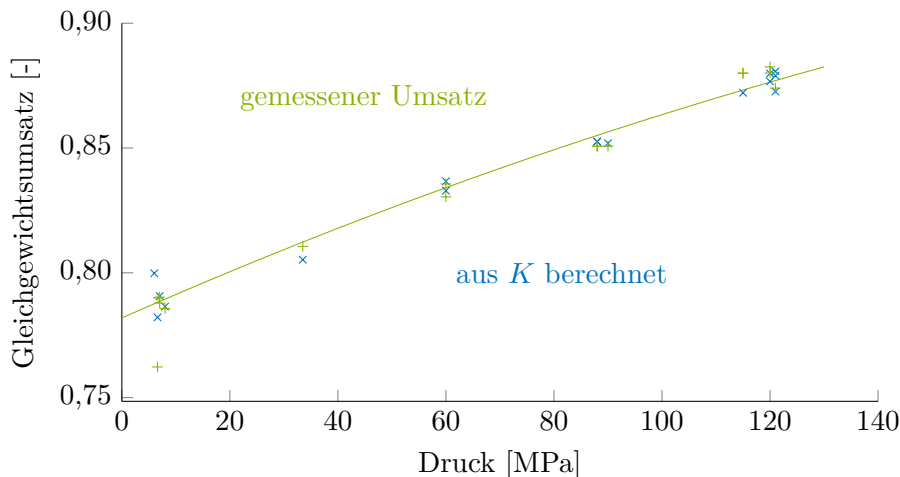


Abbildung 4.19: Gemessener Gleichgewichtsumsatz und aus der Gleichgewichtskonstante berechneter. Gezeigt sind die gleichen Experimente, die auch in Abbildung 4.18 ausgewertet wurden. Die durchgezogene Linie ist der simulierte Verlauf des Gleichgewichtsumsatzes mittels der zuvor bestimmten Daten für K_0 und ΔV .

Gleichung (3.67) wurde die Gleichung als anwendbar bewertet und für spätere Wirtschaftlichkeitsanalysen verwendet.

Zudem wurde aus der Übereinstimmung der Werte (direkt vermessener Umsatz und mittels Gleichgewichtskonstante berechneter Umsatz) deutlich, dass die Konzentrationen aller Reaktanten konsistent vermessen wurden. (Bei dem vermessenem Umsatz wurde nur die vermessene Konzentration von ManNAc verwendet, während bei der berechneten Gleichgewichtskonstante ManNAc, Pyr und Neu5Ac berücksichtigt wurden.)

Die meisten der in Abbildungen 4.18 und 4.19 gezeigten Messergebnisse wurden bei der Verwendung von einem Substratverhältnis von 2,5 gemessen. Mittels Gleichung (3.67) wurde der Gleichgewichtsumsatz für ein Verhältnis von 1:1 berechnet und betrug 50,7%. Experimentell bestimmt wurden die Umsätze 50,7% und 51,4%.

Zum Vergleich mit anderen Forschungsergebnissen wurde die Gleichgewichtskonstante bei Referenzdruck herangezogen ($(20,9 \pm 0,9)$ L/mol). Häufig wurden Werte von 28,7 L/mol bis 29,4 L/mol bei verschiedenen Temperaturen (25 °C bis 50 °C) veröffentlicht [41, 47, 176]. Groher und Hoelsch haben bei 30 °C und pH 7,5 eine Gleichgewichtskonstante von $(20,7 \pm 4,1)$ L/mol experimentell und $(21,7 \pm 1,3)$ L/mol per Haldane-Beziehung bestimmt [43]. Hooks und Mitarbeiter erreichten einen Umsatz von 97%, was eine Gleichgewichtskonstante von 32,7 L/mol bedeutet [47].

Da ein Unterschied von 20 L/mol bis 29 L/mol eine Erhöhung des Gleichgewichtsumsatzes von 77,5% auf 82,8% bedeutet, ist dies eine signifikante Änderung, die weiter untersucht werden sollte.

4.4.2 Kinetik

Für die Reaktionskinetik der Aldolase wurden mehrere Modelle für die Reaktionskinetik veröffentlicht und diskutiert (Abschnitt 3.1.3). Diese unterscheiden sich nur, wenn ManNAc und Pyr bei der Reaktion anwesend sind (Hinreaktion). Bei der Rückreaktion (ausschließlich Neu5Ac vorhanden) vereinfachen sich die Geschwindigkeitsausdrücke zu demselben Ausdruck (Gleichung (3.6)).

Die Reaktionsrate wurde mittels des Festbettreaktors bei Niedrig- und Hochdruck bestimmt. Anhand der Messdaten der Hinreaktion wurde ein Geschwindigkeitsausdruck für die Reaktionskinetik gewählt.

Hinreaktion

Für die Auswertung wurden drei Modelle für die Reaktionsgeschwindigkeit verwendet, welche aus der Literatur bekannt sind. Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter wurden die Konzentrationen von ManNAc und Pyr unabhängig voneinander variiert und alle Daten zur Regression zeitgleich verwendet (Abbildung 4.20). Als Geschwindigkeitsausdruck ist exemplarisch der „rapid-equilibrium“-Ansatz nach Groher und Mitarbeitern verwendet worden.

Zwei Messwerte bei Hochdruck wurde als Ausreißer deklariert und aus weiteren Analysen entfernt, da die Reaktionsrate deutlich höher als die Reaktionsrate bei ähnlichen Konzentrationen war. Um diese Entfernung zu beurteilen, wurden die Abweichungen zwischen der Regressionskurve und den Messwerten in einem Quantil-Quantil-Diagramm (QQ-Diagrammen) dargestellt (Abbildung 4.21). Bei einer passenden Regression sollten die Abweichungen normal-verteilt sein, was zu Geraden im QQ-Diagramm führt [177]. Die Regression wurde einmal unter Berücksichtigung aller Messwerte und einmal ohne die deklarierten Ausreißer durchgeführt und die jeweiligen Abweichungen in QQ-Diagrammen dargestellt (Abbildung 4.21a und Abbildung 4.21b). Es ist zu erkennen, dass bei der Verwendung von allen Messwerten die Abweichungen weiter von der Gerade entfernt sind als bei dem reduzierten Datensatz. Somit wurde die Deklaration als gerechtfertigt angesehen und dieses Paar bei den weiteren Betrachtungen entfernt.

Die aus den Messdaten berechneten kinetischen Parameter sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Hierfür steht „steady-state“ für den Geschwindigkeitsausdruck nach Gleichung (3.15), „rapid-equilibrium“ für Gleichung (3.17) und „MM-2Sub“ (kurz für Michaelis-Menten-2-Substrat) für Gleichung (3.18)

Bei dem Geschwindigkeitsausdruck mit „steady-state“-Ansatz fiel auf, dass die Konfidenzintervalle aller Parameter deutlich größer als die Werte selbst waren (z.B. $(0,23 \pm 2,10)$ mol/L). Bei Niedrigdruck wies K_M^P einen Wert von $(0,0 \pm 1,9)$ mol/L auf. Wird 0 mol/L als K_M^P verwendet, vereinfacht sich das Modell um einen Parameter und ist identisch zu dem „rapid-equilibrium“-Ansatz von Groher und Mitarbeitern (Gleichung (3.17)). Aus diesem Grund wurden die großen Konfidenzintervalle mit einer Überanpassung durch zu viele Parameter erklärt. Bei Hochdruck waren die Werte für K_M^P und K_I^P (ohne Konfidenzintervalle) sehr klein, was weiterhin eine Überanpassung bedeuten konnte. Aufgrund

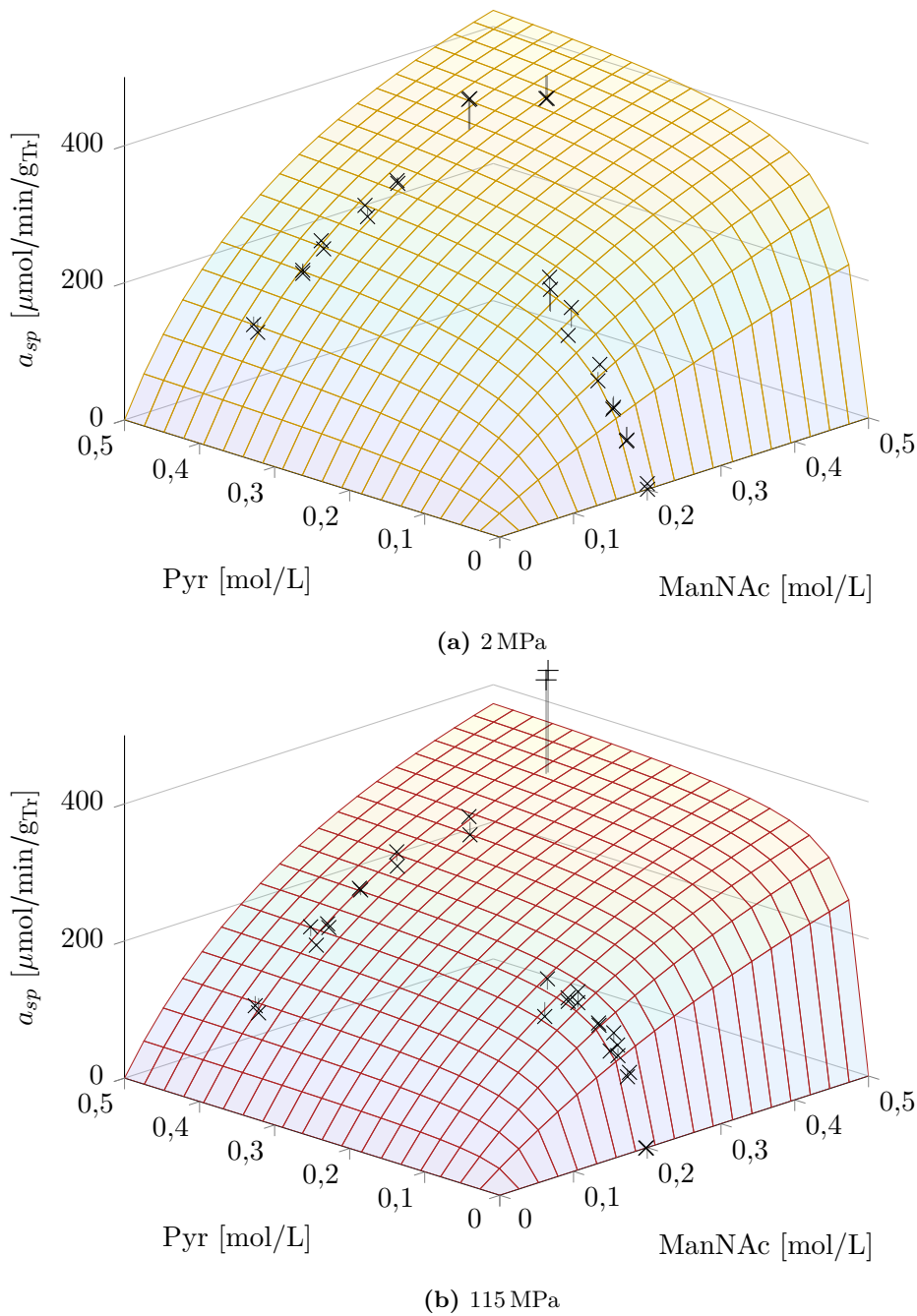


Abbildung 4.20: Reaktionsrate der Aldolase bei verschiedenen Konzentrationen und Drücken. Die eingezeichneten Flächen sind die Regressionsfunktionen für die Reaktionskinetik nach dem „rapid-equilibrium“-Ansatz. Die Linien von den Messwerten zur Regressionsfläche sind visuelle Hilfslinien. Bei 0,4 mol/L Pyr betrug die Flussrate 1,5 mL/min. Bei 0,2 mol/L ManNAc betrug die Flussrate 2 mL/min. Generell: Temperatur 40 °C, 100 mM KP_i -Puffer, pH 7,50, 179,8 mg Aldolase-Träger-Präparat, Reaktorvolumen 0,70 mL. Nach Änderungen der Reaktionsbedingungen wurden 3 min bzw. 3,5 min gewartet, bevor die nächste Probe entnommen wurde.

4 Ergebnisse

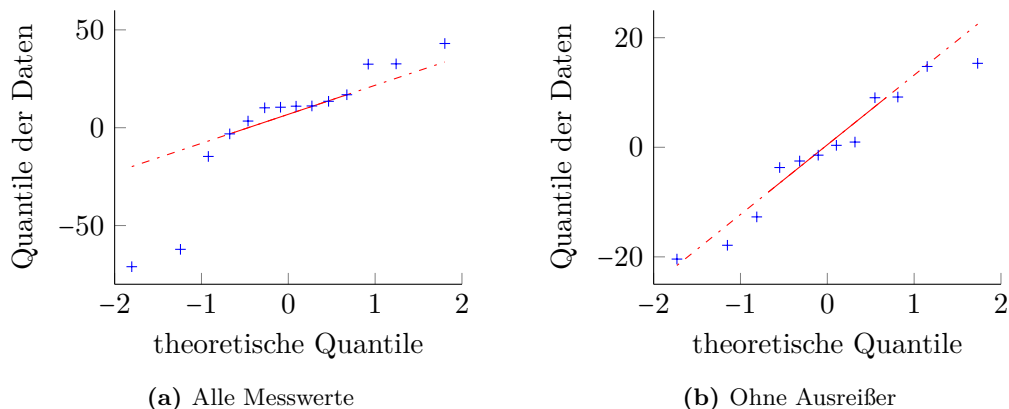


Abbildung 4.21: QQ-Diagramme mit und ohne die deklarierten Ausreißer.

Tabelle 4.2: Kinetische Parameter der Hinreaktion der Aldolase nach verschiedenen Modellen. Messdaten aus Abbildung 4.20. Enzymbeladung $0,074 \text{ g}_E/\text{g}_{\text{Tr}}$.

steady-state	$(2,0 \pm 0,1) \text{ MPa}$	$(115,0 \pm 5,8) \text{ MPa}$
K_M^M [mol/L]	$0,23 \pm 2,10$	$0,342 \pm 0,700$
K_M^P [mol/L]	$0,0 \pm 1,9$	$0,019 \pm 0,510$
K_I^P [mol/L]	$0,91 \pm 2,00$	$0,025 \pm 0,290$
$a_{sp,max}$ [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$]	$651 \pm 3\,400$	657 ± 850
R^2	0,9573	0,9786
RMSE [mol/min/g _{Tr}]	$24 \cdot 10^{-6}$	$12 \cdot 10^{-6}$
MM-2Sub	$(2,0 \pm 0,1) \text{ MPa}$	$(115,0 \pm 5,8) \text{ MPa}$
K_M^M [mol/L]	$0,28 \pm 0,12$	$0,35 \pm 0,12$
K_M^P [mol/L]	$0,050 \pm 0,018$	$0,023 \pm 0,004$
$a_{sp,max}$ [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$]	740 ± 170	660 ± 140
$a_{sp,max}$ [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_E$]	$(10,0 \pm 2,3) \cdot 10^3$	$(8,9 \pm 1,9) \cdot 10^3$
R^2	0,9571	0,9786
RMSE [mol/min/g _{Tr}]	$24 \cdot 10^{-6}$	$11 \cdot 10^{-6}$
rapid-equilibrium	$(2,0 \pm 0,1) \text{ MPa}$	$(115,0 \pm 5,8) \text{ MPa}$
K_M^M [mol/L]	$0,23 \pm 0,11$	$0,320 \pm 0,120$
K_M^P [mol/L]	$0,091 \pm 0,045$	$0,037 \pm 0,010$
$a_{sp,max}$ [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$]	650 ± 150	630 ± 130
$a_{sp,max}$ [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_E$]	$(8,8 \pm 2,0) \cdot 10^3$	$(8,5 \pm 1,8) \cdot 10^3$
R^2	0,9573	0,9786
RMSE [mol/min/g _{Tr}]	$24 \cdot 10^{-6}$	$11 \cdot 10^{-6}$

der hohen Unsicherheiten in den einzelnen Werten, wurde an dieser Stelle keine Effekt von Druck auf die einzelnen kinetischen Parameter interpretiert.

Sowohl für den Michaelis-Menten-Ansatz als auch für das Modell von Groher wiesen die einzelnen Parameter deutlich kleiner Konfidenzintervalle auf. Zudem wurden die gleichen Trends in den einzelnen Parametern festgestellt. Zum Beispiel stieg K_M^M mit Erhöhung des Drucks. Der Wert von K_M^P dagegen sank. Dies bedeutete, dass die Affinität von ManNAc zur Aldolase bei Hochdruck niedriger war als bei Niedrigdruck. Die Werte für K_M^P sanken in beiden Fälle auf 40 % des Ausgangswertes, was eine deutliche Erhöhung der Affinität bedeutet.

Da der „rapid-equilibrium“-Ansatz auf Erkenntnissen des Reaktionsmechanismus aufbaut (Pyr bindet vor ManNAc am aktiven Zentrum), ist dieser Ansatz dem 2-Substrat-Michaelis-Menten-Ansatz vorzuziehen und wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendet.

Eine alternative Darstellung der drei-dimensionalen Abbildung 4.20 ist in den zwei-dimensionalen Abbildungen 4.22a und 4.22b gegeben.

Hierbei ist die Konzentration eines Substrates konstant und nur die andere variiert (z.B. Pyr bei 400 mM und ManNAc variiert). Wie auch in Abbildung 4.20 ist der Geschwindigkeitsausdruck nach dem „rapid-equilibrium“-Ansatz (Gleichung (3.17)) verwendet worden.

In Abbildung 4.22a fällt auf, dass sich die Vertrauensintervalle der Regressionen für Umgebungs- und Hochdruck überschneiden. Dies war auch in den berechneten Parametern für K_M^M zu erkennen ($(0,23 \pm 0,11)$ mol/L und $(0,32 \pm 0,12)$ mol/L).

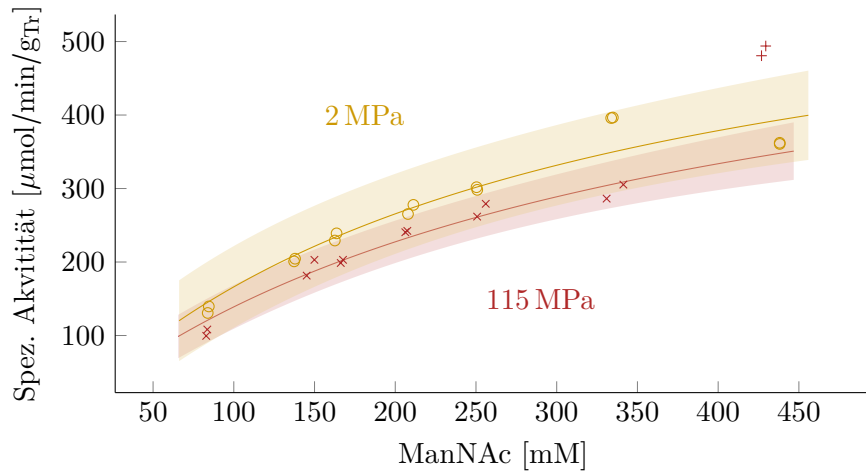
Aufgrund der Abweichung der spezifischen Aktivität für die ManNAc-Konzentrationen 336 mM und 426 mM bei Umgebungsdruck bestand die Möglichkeit von Messfehlern. Wurden auch diese Messergebnisse als Ausreißer deklariert und die Regression erneut durchgeführt, wurde K_M^M zu $(0,34 \pm 0,30)$ mol/L bestimmt. Aufgrund des großen Vertrauensintervalls wurden die Messwerte weiterhin berücksichtigt. Weiterhin war zu beachten, dass die Pyr-Konzentration nicht konstant war. Dies führt in der vereinfachten Darstellung zu Ungenauigkeiten, weshalb die drei-dimensionale Ansicht in Abbildung 4.20 der zwei-dimensionalen Ansicht vorzuziehen ist.

Während der Trend der Reduktion von K_M^P in Abbildung 4.22b erkennbar ist ($(0,091 \pm 0,045)$ mol/L zu $(0,037 \pm 0,010)$ mol/L), können die kinetischen Parameter nicht ohne weiteres aus der Abbildung bestimmt werden. Nur bei einem Geschwindigkeitsausdruck nach Michaelis-Menten wäre dies analog zu Abbildung 3.4 möglich.

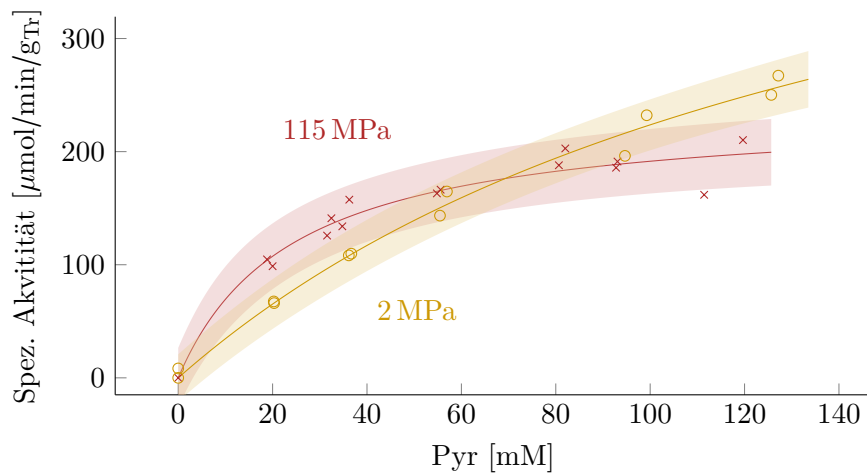
Welcher physikalische Effekt die reduzierte Affinität von ManNAc und gesteigerte Affinität von Pyr erklärt, konnte in diesem Rahmen nicht beantwortet werden. Denkbar wäre, dass das aktive Zentrum der Aldolase unter Hochdruck besser zugänglich war und dies die gesteigerte Affinität von Pyr erklärt. Wenn dies der Fall wäre, hätte die Affinität von ManNAc auch erhöht sein müssen.

Aus der UHPLC-Analytik ist bekannt, dass eine Veränderung des molaren Volumens aufgrund von Hochdruck möglich ist [169].

4 Ergebnisse



(a) Pyr-Konzentration 360 mM bis 400 mM



(b) ManNAc-Konzentration 190 mM bis 200 mM

Abbildung 4.22: Spezifische Aktivität der Aldolase in Abhängigkeit verschiedener ManNAc- oder Pyr-Konzentrationen. Sonstige Bedingungen wie Abbildung 4.20

Um zu untersuchen, ob Hochdruck irreversible Effekte zur Folge hatte, wurde direkt im Anschluss der selbe Reaktor verwendet, welcher auch in einem Versuch von Abbildung 4.20 verwendet wurde.

Hierfür wurden 100 mM ManNAc und 400 mM Pyr bei Drücken bis 46,1 MPa. Die erhaltenen Aktivitäten wiesen Werte von $79 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$ bis $162 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$ bei Drücken bis 46,1 MPa auf. Die in Abbildung 4.20 gezeigten Werte weisen für diese Konzentrationen Werte von $135 \mu\text{mol}/\text{L}/\text{g}_{\text{Tr}}$ (bei 2 MPa) und $100 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$ (bei 115 MPa) auf. Somit wurden irreversible Effekte durch Druck ausgeschlossen.

Um die Größenordnung der spezifischen Aktivität der verwendeten Aldolase einzuordnen, wurden Daten aus der Literatur auch von anderen Aldolasen und Betriebsweisen der Reaktoren herangezogen.

Die untersuchte Aldolase zeigte eine geringere spezifische Aktivität als andere freie Aldolasen $12,7 \cdot 10^3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ [176], $76 \cdot 10^3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ [44]. Verglichen mit anderen, immobilisierten Aldolasen, waren die spezifischen Aktivitäten in der gleichen Größenordnung: $590 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$ [47] und höher als andere Aldolasen $69 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$ [46].

Während der Wert für K_M^M in der gleichen Größenordnung zu anderen Veröffentlichungen mit freien Enzymen lag ($(141 \pm 8) \text{mM}$) [43], war der gemessene Wert für Pyr mit 91 mM deutlich höher als 2,25 mM [43]. Andere Gruppen haben für K_M^M Werte von 220 mM bis 287 mM und für K_M^P von 22 mM bis 206 mM berichtet [44].

Rückreaktion

Da die Untersuchungen zur Rückreaktion nur mittels Neu5Ac durchgeführt wurden, vereinfachte sich der Geschwindigkeitsausdruck zu der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = v_{max} \frac{c_N}{K_M^N + c_N} \quad (4.5)$$

Dieser Ausdruck wurde entsprechend für die Regression verwendet. Bei der Hinreaktion wurde deprotonierte Brenztraubensäure (Pyr) verwendet, wodurch der pH-Wert der Lösung nicht beeinflusst wurde. In den Untersuchungen zur Hinreaktion wurde entsprechend deprotoniertes Neu5Ac gebildet, welches den pH-Wert nicht verändert. Bei den Versuchen zur Rückreaktion wurde Neu5Ac verwendet, welches in protonierter Form vorlag, sodass der pH-Wert auf 2 reduziert wurde. Aus diesem Grund wurden deutlich höhere Pufferkonzentrationen (200 mM) verwendet als bei den Versuchen zur Hinreaktion (100 mM), wodurch ein potentieller systematischer Fehler entstand. Des Weiteren wurde die Lösung anschließend mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7,19 neutralisiert. Da in den Chromatogrammen das Signal von KP_i -Puffer und Neu5Ac überlagerten, wurden für diese Auswertung die mittels der Mischkammer eingestellten Konzentrationen für Neu5Ac verwendet. (Bei vorherigen Versuchen wurden stets die gemessenen Konzentrationen verwendet.)

Tabelle 4.3 listet die gemessenen kinetischen Parameter auf, welche mittels der Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 4.23) berechnet wurden.

Es wurde sowohl eine Reduktion in der Michaelis-Menten-Konstante, als auch der maximalen spezifischen Aktivität festgestellt. In den 70er Jahren haben einige Autoren

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3: Kinetische Parameter der Rückreaktion der Aldolase. Reaktionsbedingungen in Abbildung 4.23.

	(2,5 ± 0,4) MPa	(48 ± 3) MPa	(93 ± 14) MPa
K_M^N [mol/L]	0,650 ± 0,295	0,530 ± 0,093	0,365 ± 0,260
$a_{sp,max}$ [μ mol/min/g _{Tr}]	743 ± 230	670 ± 165	403 ± 170
R^2	0,9762	0,9841	0,8934
RMSE [mol/min/g _{Tr}]	$12 \cdot 10^{-6}$	$8,9 \cdot 10^{-6}$	$19 \cdot 10^{-6}$

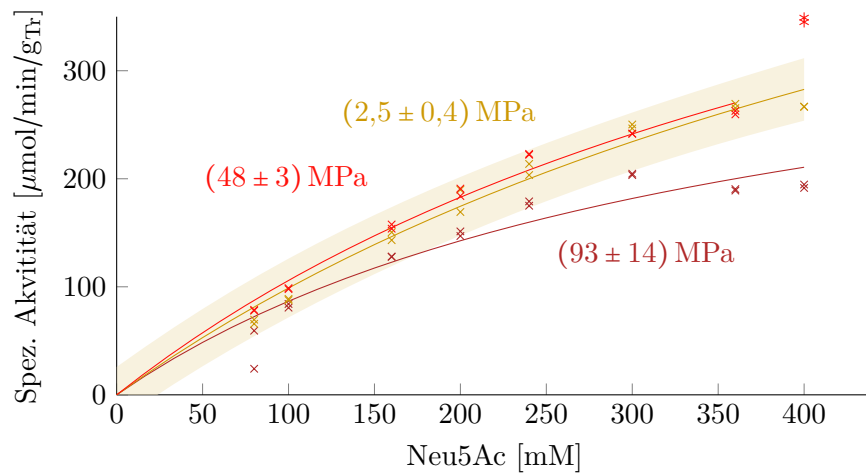


Abbildung 4.23: Reaktionsrate der Rückreaktion der Aldolase mit Regressionskurve bei verschiedenen Drücken. Bedingungen: Reaktorvolumen: 0,35 mL, 40 °C, 129,7 mg Aldolase-Träger-Präparat, Flussrate 1,0 mL/min bei Niedrigdruck und sonst 0,9 mL/min, 200 mM KP_i-Puffer (ursprünglich pH 7,50) mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,19 justiert.

Druck wie einen Inhibitor behandelt, die Michaelis-Menten-Gleichung entsprechend angepasst und Lineweaver-Burk-Diagramme produziert [80, 178, 179]. Auch in aktuellen Veröffentlichungen wurde der Einfluss von Druck auf kinetische Parameter ähnlich wie die Wirkung von Inhibitoren beschrieben [74]. Mit die vorliegenden Daten wurde kein passender Inhibierungstyp (kompetitiv, nicht-kompetitiv oder unkompetitiv) festgestellt.

Unter Kenntnis der kinetischen Parameter für Hin- und Rückreaktion wurden mittels der Haldane-Beziehung die Lage des Gleichgewichts für Niedrig- und Hochdruck bestimmt. Dabei wurden die kinetischen Parameter des „rapid-equilibrium“-Ansatz verwendet (Tabelle 4.2). Berechnet wurde eine Gleichgewichtskonstante von $(27,2 \pm 24,7)$ L/mol für Niedrigdruck und $(48,2 \pm 46,8)$ L/mol bei Hochdruck. Die hohe Unsicherheit in beiden Werten wird durch die Fehler in allen fünf Parametern erklärt, welche in die Fehlerfortpflanzung eingingen und entsprechend summiert wurden. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass die Werte der Gleichgewichtskonstanten sehr gut mit den Literaturwerten für Umgebungsdruck (27 L/mol) und den gemessenen Werten für Hochdruck ($(43,9 \pm 3,0)$ L/mol) übereinstimmten (Abschnitt 4.4.1).

Um genauere Werte für K_M^N zu erhalten sollten Substratkonzentrationen bis zu einem vielfachen von K_M verwendet werden [122]. Hierbei wird die Einstellung des pH-Wertes die Hauptherausforderung darstellen.

Zusammenfassung: Kinetik

Bei der alleinigen Betrachtung der kinetischen Parameter der Hinreaktion wurden die Geschwindigkeitsausdrücke von 2-Substrat-Michaelis-Menten und dem „rapid-equilibrium“-Ansatz als gleichwertig identifiziert. Es liefert jedoch nur das Modell nach dem „rapid-equilibrium“-Ansatz konsistente Daten zum Reaktionsgleichgewicht, da bei dem 2-Substrat-Michaelis-Menten-Ansatz mit Rückreaktion der Wert für die Gleichgewichtskonstante von den initialen Konzentrationen abhängt.

Zudem verwendet der „rapid-equilibrium“-Ansatz Kenntnisse aus dem Reaktionsmechanismus, weshalb dieser Ausdruck für die Reaktionsgeschwindigkeit vorzuziehen ist.

Das Modell nach dem „steady state“-Ansatz wies aufgrund zusätzlicher kinetischen Parameter hohe numerische Unsicherheiten auf und wurde deshalb nicht weiter berücksichtigt.

Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit das Modell mittels „rapid-equilibrium“-Ansatz verwendet.

4.4.3 Zusammenfassung

Die Lage des Gleichgewichts der Aldolase konnte positiv durch Hochdruck beeinflusst werden, was auf eine Reduzierung des molaren Volumens zwischen den Reaktanten ManNAc, Pyr und Neu5Ac zurückgeführt wurde. Aus diesem Grund stieg der Gleichgewichtsumsatz von 79 % auf 88 % bei sonst identischen Reaktionsbedingungen an. Für diese Untersuchungen wurde der entwickelte Umlaufreaktor verwendet. Die Probenentnahme erfolgt

4 Ergebnisse

während die Reaktion Hochdruck ausgesetzt war aus dem Pufferbehälter, welcher unter Umgebungsdruck stand.

Der Geschwindigkeitsausdruck nach dem „rapid-equilibrium“-Ansatz (Gleichung (3.17)) stellte sich für die Beschreibung der Reaktionskinetik als geeignet heraus. Mit den berechneten kinetischen Parametern konnte mittels der Haldane-Beziehung die Lage des Gleichgewichts konsistent zu den vorherigen, direkt vermessenen Ergebnissen berechnet werden.

Besonders hervorzuheben war hierbei die Affinität von Pyr zu der Aldolase, welche mit dem Druck deutlich stieg.

4.5 Epimerase

Auch für die Epimerase wurden die kinetischen Parameter sowie die Lage des Gleichgewichts bei Niedrig- und Hochdruck bestimmt. Aufgrund der höheren Reaktionsrate und des niedrigen Gleichgewichtsumsatzes wurden die kinetischen Parameter sowohl über die Methodik der Anfangsreaktionsrate, als auch über das zeitliche/örtliche Integral der Reaktionsrate bestimmt.

4.5.1 Kinetik

Die kinetischen Parameter wurden für den Geschwindigkeitsausdruck in Abschnitt 3.1.2 berechnet.

Wie bei den kinetischen Untersuchungen der Aldolase (Abschnitt 4.4.2) wurden Hin- und Rückreaktion getrennt voneinander analysiert. Der Geschwindigkeitsausdruck nahm in diesem Fall die Form einer Michaelis-Menten-Kurve an, welche für die Regression verwendet wurde.

Hinreaktion

In Abbildung 4.24 sind die berechneten Reaktionsraten in Abhängigkeit der GlcNAc-Konzentration bei verschiedenen Drücken dargestellt. Die berechneten kinetischen Parameter sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Aus dem Vertrauensbereich in Abbildung 4.24, sowie aus den starken Überschneidungen der Konfidenzbereiche wurde geschlossen, dass kein signifikanter Einfluss durch den Druck auf die Reaktionskinetik der Hinreaktion vorhanden waren. Nach Gleichung (1.1) beeinflusst die Änderung des molaren Volumens vom Ausgangs- zum Übergangszustand (ΔV^\ddagger) die kinetische Reaktionskonstanten. Da keine Änderung festgestellt wurde, wurde $\Delta V^\ddagger \approx 0 \text{ mL/mol}$ bestimmt. Der von Wang und Mitarbeitern vorgeschlagene Reaktionsmechanismus beinhaltet die Öffnung des Zuckerrings zu einem Aldehyd [125].

Andersen und Grønland haben die Mutarotation von α -Glucose (α -Glc) zu β -Glucose (β -Glc) untersucht und ein negatives Aktivierungsvolumen mit einem Aldehyd (geöffneter Ring) als Übergangszustand vermessen [92]. Martinez-Monteagudo und Saldañazu schrieben, dass Ringöffnungen zu kleineren molaren Volumina führen und so unter Druck favorisiert seien [180].

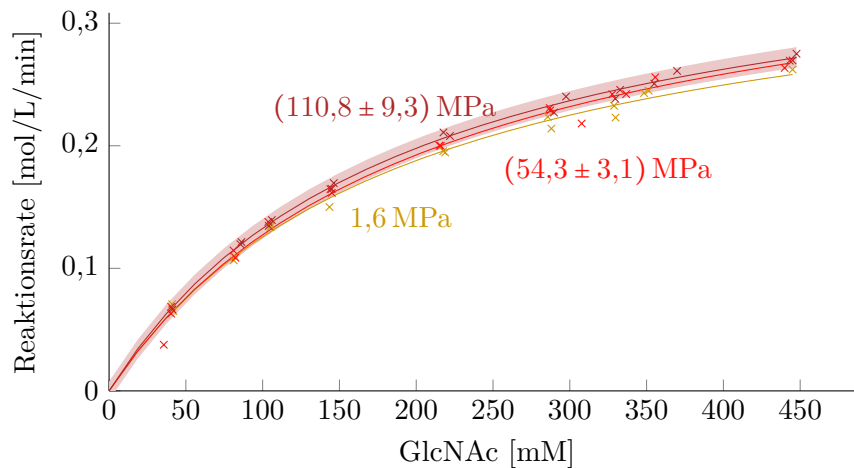


Abbildung 4.24: Reaktionsrate der Hinreaktion der Epimerase bei verschiedenen Drücken. Beispielhaft wurde für den Versuch bei Hochdruck der Vertrauensbereich eingezeichnet. Bedingungen: Reaktorvolumen: 0,21 mL, 40 °C, 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 55 mg Epimerase-Träger-Präparat, Flussrate 2 mL/min, 100 mM KP_i-Puffer bei einem pH-Wert von 7,5.

Tabelle 4.4: Berechnete kinetische Parameter der Hinreaktion der Epimerase und Statistiken zu den Regressionskurven. Versuchsbedingungen in Abbildung 4.24.

Parameter	1,6 MPa	54,3 MPa	110,8 MPa
K_M^G [mM]	195,1 ± 25,7	208,1 ± 34,0	193,0 ± 9,3
v_{max} [mol/L/min]	0,37 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,39 ± 0,01
$a_{sp,max}$ [μ mol/min/g _{Tr}]	1 324 ± 77	1 400 ± 104	1 388 ± 47
R^2	0,9937	0,9908	0,9974
RMSE	5,321 · 10 ⁻³	7,348 · 10 ⁻³	3,607 · 10 ⁻³

Da kein Einfluss von Druck auf die kinetischen Parameter gefunden wurde, wurde geschlossen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht die Ringöffnung war und die Reaktion somit unabhängig vom Druck erschien.

Für die Michaelis-Menten-Konstante für GlcNAc wurden in aktueller Literatur Werte von (17,6 ± 2,6) mM (bei 2 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 37 °C und pH 7,0 15 mM KP_i-Puffer in einem Satzreaktor) [42], 14,01 mM (bei mindestens 2 mM ATP, mindestens 2 mM MgCl₂, 25 °C und pH 7,5 in einem Satzreaktor) [41] und 21,3 mM (bei 5 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 37 °C und pH 7,5 in einem Satzreaktor) [181] veröffentlicht. In dieser Arbeit wurde die Michaelis-Menten-Konstante für GlcNAc zu 193 mM bis 208 mM bestimmt, welche nicht in vergleichbarer Größenordnung zu den Ergebnissen der Literatur war.

In einem Satzreaktor haben Hu und Mitarbeiter eine maximale spezifische Aktivität der Immobilisate von 78,18 μ mol/min/g gemessen [46]. Hu und Mitarbeiter haben diese mit dem Feuchtgewicht angegeben, wodurch dieser Wert niedriger als mit entsprechendem Trockengewicht ist. Obst und Mitarbeiter geben eine maximale spezifische Aktivität für

4 Ergebnisse

freie Epimerase von $15\,000\ \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ an [24]. Wurde die Beladung der Immobilisate berücksichtigt ($0,041\ \text{g}_E/\text{g}_{\text{Tr}}$), wurde eine spezifische Aktivität von $35\,000\ \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_E$ bestimmt. Hooks und Mitarbeiter haben für immobilisierte Epimerase eine Aktivität von $32\ \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$ in einem Satzreaktor vermessen [47]. Der deutlich höhere Wert von $1\,400\ \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$, welcher in dieser Arbeit bestimmt wurde, wurde auf die reduzierte Filmdiffusion zurückgeführt, welche durch das durchströmte Festbett ermöglicht wurde.

Inhibierung durch Pyruvat

Um die Inhibierung durch Pyr bei verschiedenen Druckstufen zu quantifizieren, wurde die Konzentration von Pyr variiert, während die Konzentration von GlcNAc konstant war. Aus dieser Versuchsreihe wurde die Inhibierungskonstante berechnet. Dieses Vorgehen wurde bei drei verschiedenen Druckstufen durchgeführt.

Um irreversible Deaktivierung auszuschließen wurden die Konzentrationen von Pyr randomisiert und zum Abschluss die Reaktionsrate mit $0\ \text{mM}$ Pyr bestimmt.

Da die Reaktionsgeschwindigkeit hier wieder in der gleichen Größenordnung lag, wurde eine Deaktivierung über die Dauer der Versuche ausgeschlossen. In Abbildung 4.25 sind neben den Regressionskurven nach Gleichung (4.6) auch exemplarisch ein Vorhersageintervall eingezeichnet.

$$v = \frac{a}{K_M \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_I}\right) + c_G} \quad (4.6)$$

Für die Regressionsrechnung wurden die gemessenen Konzentrationen von Pyr und GlcNAc und K_M^G als $0,2\ \text{mol}/\text{L}$ eingesetzt. Die so bestimmten Inhibierungskonstanten sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

Es wurde festgestellt, dass sämtliche Reaktionsraten in dieser Versuchsreihe maximal $0,2\ \text{mol}/\text{L}/\text{min}$ betragen. Bei der Versuchsreihe, in welcher die GlcNAc-Konzentration variiert wurde (Abbildung 4.24), war die maximale Reaktionsraten $0,28\ \text{mol}/\text{L}/\text{min}$.

Für die Bestimmung der Inhibierungskonstante war der absolute Wert der Reaktionsrate nicht relevant. Da die Daten dieser Versuchsreihe in sich konsistent waren wurden sie für die Berechnung verwendet. Dennoch sollte untersucht werden, wie eine solche Reduktion zustande kommt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Partikel unterschiedlich stark zerkleinert wurden, wodurch die Reaktionsrate aufgrund von Porendiffusion reduziert war.

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Konstanten der jeweiligen Druckstufen festgestellt werden ($(109 \pm 21)\ \text{mM}$ bei $1,6\ \text{MPa}$ und $(43 \pm 10)\ \text{mM}$ bei $101\ \text{MPa}$). Der Trend war hierbei abnehmend, was bedeutet, dass die Affinität von Pyr zu dem Enzym durch Druck erhöht wurde.

Um den Einfluss des Drucks auf die Inhibierungskonstante stärker aufzulösen, wurde anschließend auch die Pyr-Konzentration konstant gehalten und der Druck variiert. Das Ergebnis der gemessenen Reaktionsrate ist in Abbildung 4.26 aufgezeichnet. Erneut wurde die Reihenfolge für die Messungen randomisiert. Da eine Abnahme der Reaktionsrate

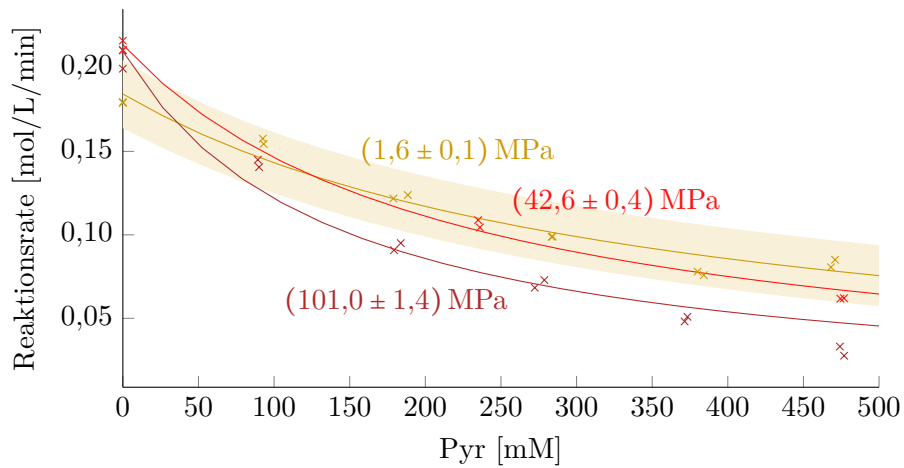


Abbildung 4.25: Inhibierung durch Pyr in Abhängigkeit von der Pyr-Konzentration bei verschiedenen Druckstufen. Bedingungen: Reaktorvolumen: 0,21 mL, 40 °C, 500 mM GlcNAc, 1 mM ATP und 1 mM MgCl₂, 57 mg Epimerase-Träger-Präparat, Flussrate 2 mL/min, 100 mM KP_i-Puffer bei einem pH-Wert von 7,50.

Tabelle 4.5: Berechnete Inhibierungskonstanten von Pyr für die Epimerase (Messdaten aus Abbildung 4.25).

Parameter	1,6 MPa	42,6 MPa	101 MPa
K_I^P [mM]	109 ± 21	68 ± 11	43 ± 10
R^2	0,965	0,995	0,966
RMSE-1000	7,76	5,27	11,54

4 Ergebnisse

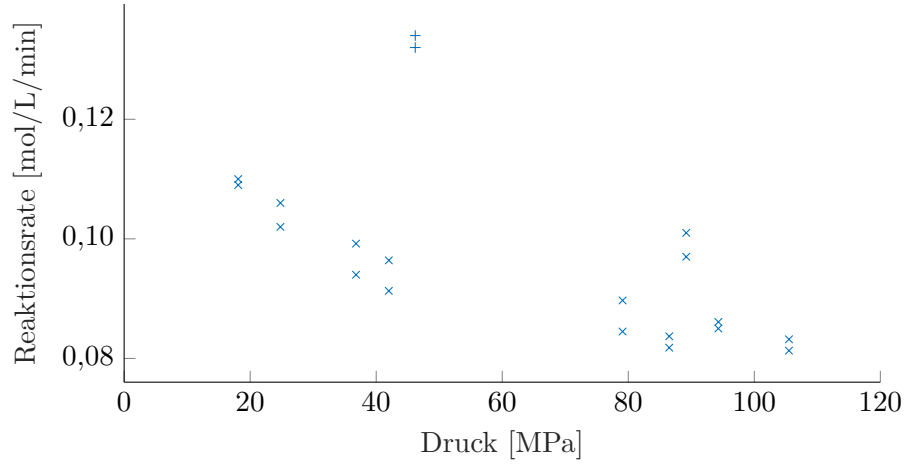


Abbildung 4.26: Inhibierung der Epimerase durch Pyr in Abhängigkeit vom Druck. Bedingungen: Reaktorvolumen: 0,21 mL, 40 °C, 450 mM GlcNAc, 400 mM Pyr, 1 mM ATP und 1 mM MgCl₂, 57 mg Epimerase-Träger-Präparat, Flussrate 2 mL/min, 100 mM KP_i-Puffer bei einem pH-Wert von 7,2. Bei mit einem Plus gekennzeichneten Messungen werden Ausreißer vermutet.

bei steigendem Druck erkennbar war, wurden irreversible Effekte des Drucks erneut ausgeschlossen.

Um aus den gemessenen Reaktionsraten die Inhibierungskonstante zu bestimmen, wurde Gleichung (3.14) nach K_I^P umgestellt. Hierzu wurde die Annahme getroffen, dass aufgrund der geringen Umsätze die Konzentration von ManNAc vernachlässigbar ist. Zudem betrug die Konzentration von Neu5Ac 0 mol/L.

$$K_I^P(p) = c_P \cdot \left(\frac{c_G}{K_M^G} \cdot \left(\frac{v_{max}}{v(p)} - 1 \right) - 1 \right)^{-1} \quad (4.7)$$

Zur Berechnung der Inhibierungskonstante nach Gleichung (4.7) wurden die per HPLC-Analyse gemessenen Konzentrationen von Pyr und GlcNAc verwendet: $c_P = 0,39$ mol/L und $c_G = 0,44$ mol/L. Wie zuvor wurde $K_M^G = 0,2$ mol/L verwendet und v_{max} wurde aus der Enzymkonzentration und der spezifischen, maximalen Aktivität berechnet:

$$v_{max} = a_{sp,max} \cdot c_E \quad (4.8a)$$

$$= 1\,400 \mu\text{mol/g}_{\text{Tr}}/\text{min} \cdot \frac{0,057 \text{ g}_{\text{Tr}}}{0,21 \text{ mL}} \quad (4.8b)$$

Abbildung 4.27 stellt die aus der Reaktionsrate berechnete Inhibierungskonstante dar. Die angegebenen Fehlerbalken wurden mittels Fehlerfortpflanzung von Gleichung (4.7) ermittelt, wobei die Konfidenzintervalle von v_{max} und K_M verwendet wurden. Die Unsicherheit von K_I^P lag zwischen 10 mM bis 18 mM.

K_I^P ist die Gleichgewichtskonstante des Inhibierungsschrittes $EI \rightleftharpoons E + I$ und stellt die Gleichgewichtskonstante mit dem Pyr-Epimerasenkomplex als Substrat dar.

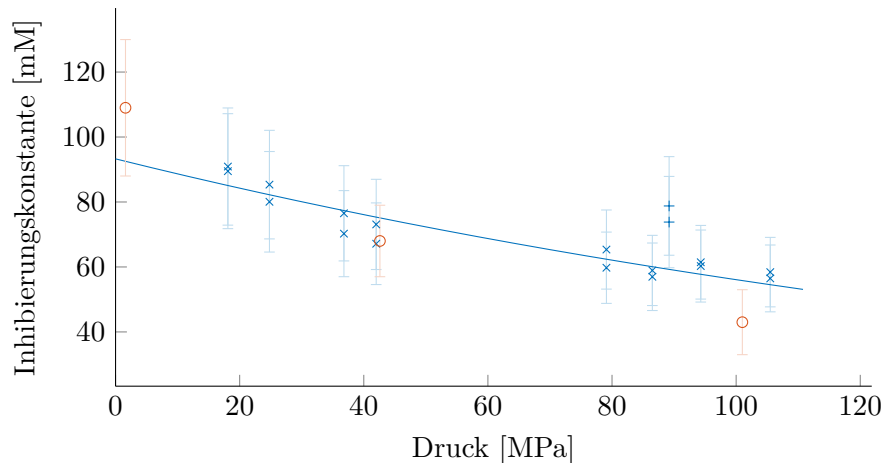


Abbildung 4.27: Ermittelte Inhibierungskonstanten in Abhängigkeit vom Druck aus den Daten von Abbildung 4.26. Orange Kreise sind zuvor bestimmte Inhibierungskonstanten nach Tabelle 4.5 als Referenz eingezeichnet. Die mit einem Plus gekennzeichneten Messungen werden als Ausreißer diskutiert.

Aus diesem Grund wurde ein exponentieller Zusammenhang zwischen der Inhibierungskonstante und Druck angenommen (Gleichung (3.66)). Die Unsicherheiten in der Inhibierungskonstante wurden für die weitere Regression nicht verwendet.

Da die Inhibierungskonstante mit Druck abnimmt, wurde aus der Regression eine positive Volumenänderung berechnet (das molare Volumen von Enzym und Pyr getrennt ist größer als das molare Volumen des Komplexes). Im Weiteren wurde die Volumenänderung der Komplexbildung ($E + I \rightleftharpoons EI$) verwendet um steigende Affinität von Pyr zu Epimerase zu verdeutlichen (höhere Gleichgewichtskonstante entspricht mehr gebundenem Enzym).

Aus dieser Regression wurde eine Volumenänderung ($-12,9 \pm 3,0$) mL/mol berechnet. Für die Regression wurden die Werte bei 89 MPa als Ausreißer deklariert (in Abbildung 4.27 ist dieser Wert durch ein Plus gekennzeichnet). Wenn diese bei der Regression berücksichtigt wurden, änderte sich die Volumenänderung zu ($-10,8 \pm 3,9$) mL/mol. Als diese Messwerte hinzugezogen, die Regression jedoch robust durchgeführt wurde, ergab sich eine Volumensänderung von ($-12,0 \pm 3,8$) mL/mol. Bei allen drei Berechnungsmethoden war die Volumenänderung negativ und somit die Inhibierung der Epimerase durch Pyr durch Druck verstärkt.

Die zuvor berechneten Inhibierungskonstanten (Tabelle 4.5) liegen innerhalb der Unsicherheiten, welche in Abbildung 4.27 bestimmt wurden (sie wurden mittels orangen Kreisen eingezeichnet). Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse als konsistent betrachtet.

Werte der Inhibierungskonstanten unter Niedrigdruck betragen 93 mM bis 109 mM. Zimmermann und Mitarbeiter haben die Inhibierungskonstante zu ($146,0 \pm 1,9$) mM bestimmt (bei 2 mM ATP, 2 mM $MgCl_2$, 37 °C und pH 7,0 15 mM KP_i -Puffer in einem Satzreaktor) [42]. Klermund und Mitarbeiter berichteten von Epimerasen aus verschiedenen Cyanobacteria-Stämmen, welche Inhibierungskonstanten über 400 mM aufwiesen [49]. Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft konnten die Inhibierungskonstanten nicht

4 Ergebnisse

direkt verglichen werden. Die starken Variationen zeigten jedoch, dass zur optimalen Prozessführung auch andere Epimerasen in Betracht gezogen werden sollten.

Aufgrund der Tatsache, dass die Affinität von Pyr zur Epimerase durch zunehmenden Druck stieg, wurde die Inhibierung verstärkt. Verglichen mit Niederdruck ist die Inhibierungskonstante um 60 % gesunken (von 109 mM auf 43 mM). Damit die Reaktion gleichermaßen inhibiert wird, müsste auch die Konzentration von Pyr um 60 % reduziert werden damit c_P/K_I^P im Geschwindigkeitsausdruck konstant bleibt. Somit sind unter Hochdruck niedrigere Konzentrationen an Pyr einzusetzen, um die Inhibierung nicht zu verstärken.

Rückreaktion

Aufgrund des hohen Wertes für K_M^G wurde auch für K_M^M ein hoher Wert angenommen und die ManNAc-Konzentration zunächst von 96 mM bis 480 mM variiert. Sowohl bei Nieder- als auch bei Hochdruck konnte kein Trend in der Reaktionsrate festgestellt werden, welche zwischen 0,2 mol/L/min bis 0,25 mol/L/min schwankte. Aus diesem Grund wurden deutlich niedrigere Konzentrationen bis 40 mM verwendet, um die kinetischen Parameter zu bestimmen. Durch die initialen Experimente konnte gezeigt werden, dass keine Inhibierung durch ManNAc bis 480 mM auftrat.

Trotz der niedrigen Kontaktzeit von knapp 4 s ($\frac{0,66 \cdot 0,21 \text{ mL}}{1,8 \text{ mL/min}}$), betrug der Umsatz von ManNAc bis zu 40 %. Da die kinetischen Parameter über die Rate der Anfangsgeschwindigkeit bestimmt werden sollten, wurden niedrige Umsätze relativ zum Gleichgewichtsumsatz gefordert. Die Flussrate wurde nicht weiter erhöht, um ein vergleichbares Strömungsprofil zu den Versuchen zur Hinreaktion zu gewährleisten. Dies stellte einen potentiellen Fehler dar, weshalb die gemessenen Konzentrationen auf verschiedene Arten ausgewertet wurden. Zum einen wurde, wie bisher, die Reaktionsrate über die Steigung der Konzentration im Reaktor berechnet (es wurde ein linearer Verlauf angenommen). Das Ergebnis dieses Ansatzes ist in Abbildung 4.28 zu finden. Zum anderen wurde die Differentialgleichung (DGL) mit kinetischen Parametern integriert, was folgenden Ausdruck lieferte:

$$t = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \ln \frac{c_{S,0}}{c_S} + (c_{S,0} - c_S) \frac{1}{v_{max}} \quad (4.9)$$

Hierbei ist $c_{S,0}$ die initiale Substratkonzentration (in mol/m³). Mit bekannter Reaktionszeit (in diesem Fall die Verweilzeit), Anfangskonzentration und gemessener Endkonzentration konnten K_M und v_{max} bestimmt werden. Das Ergebnis der Integralmethode ist in Tabelle 4.6 aufgeführt. Zudem wurden die Daten der Hinreaktion berücksichtigt und mittels der Haldane-Beziehung die Lage des Gleichgewichts bestimmt und ebenfalls in Tabelle 4.6 angegeben.

Die berechneten kinetischen Parameter wiesen zwar ähnliche Werte auf, allerdings war die mittels der Haldane-Beziehung bestimmte Gleichgewichtskonstante bei der Integralmethode mit $0,174 \pm 0,001$ bzw. $0,233 \pm 0,050$ näher an Werten aus der Literatur: Klermund und Mitarbeiter verwenden $0,262 \pm 0,004$ [50], Zimmermann und Mitarbeiter $0,26 \pm 0,09$ [42] und Kragl $0,201 \pm 0,011$ [41]. Andere Arbeitsgruppen haben Gleichgewichtsumsätze von 18 % bis 22 % festgestellt [46, 47].

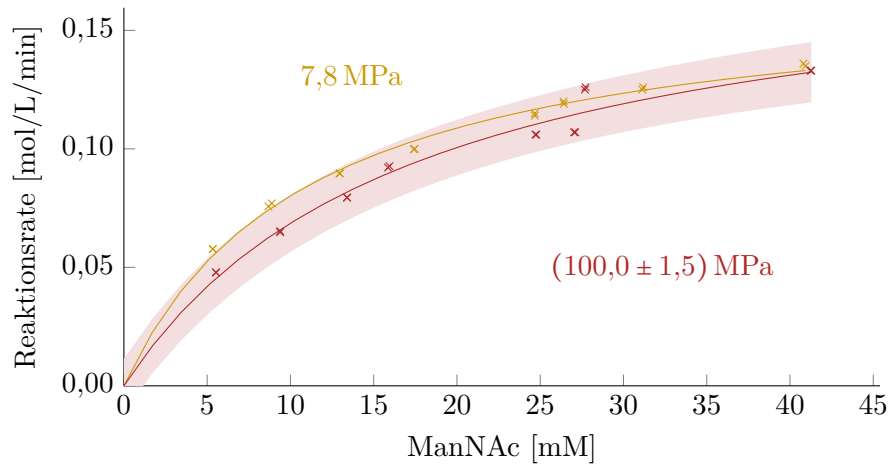


Abbildung 4.28: Reaktionsrate der Rückreaktion der Epimerase bei verschiedenen Drücken. Bedingungen: Reaktorvolumen: 0,21 mL, 40 °C, 1 mM ATP und 1 mM MgCl₂, 57 mg Epimerase-Träger-Präparat, Flussrate 1,8 mL/min (Verweilzeit 4,6 s), 10 mM KP_i-Puffer bei einem pH-Wert von 7,51. Zur Bestimmung der Reaktionsrate wurde ein linearer Verlauf der Konzentrationen im Reaktor angenommen.

Tabelle 4.6: Berechnete kinetische Parameter der Rückreaktion der Epimerase und Statistiken zu den Regressionskurven mittels Anfangsreaktionsgeschwindigkeit sowie mittels der Integralmethode. Zusätzlich wurde mittels der Haldane-Beziehung die Gleichgewichtskonstante und der -umsatz bestimmt.

Anfangsreaktionsrate	7,8 MPa	100 MPa
K_M^M [mM]	17 ± 5	11 ± 1
v_{max} [mol/L/min]	0,19 ± 0,02	0,161 ± 0,006
$a_{sp,max}$ [μ mol/min/g _{Tr}]	693 ± 73	593 ± 22
R^2	0,9675	0,9924
RMSE	$5,281 \cdot 10^{-3}$	$2,311 \cdot 10^{-3}$
K	0,17 ± 0,05	0,13 ± 0,01
X_{GGW} [%]	14,5 ± 3,7	11,5 ± 0,8
Integralmethode	7,8 MPa	100 MPa
K_M^M [mM]	16 ± 1	24 ± 4
v_{max} [mol/L/min]	0,179 ± 0,004	0,20 ± 0,02
$a_{sp,max}$ [μ mol/min/g _{Tr}]	660 ± 15	740 ± 74
K	0,174 ± 0,001	0,233 ± 0,050
X_{GGW} [%]	15,0 ± 0,1	19 ± 3

4 Ergebnisse

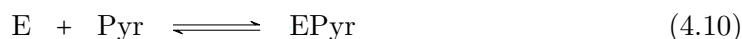
Da die mittels der Haldane-Beziehung bestimmten Gleichgewichtsparameter der Integralmethode näher an denen anderer Gruppen sind, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit dieser Satz an Parametern verwendet.

Für die Michaelis-Menten-Konstante für ManNAc wurden in aktueller Literatur Werte von 31,6 mM bis 211 mM [50], $(99,3 \pm 11,4)$ mM [42], 35,19 mM [41] und 12,8 mM [181] angegeben. Diese Werte stammten aus Experimenten mit unterschiedlichen Epimerasen, weshalb ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Wie bei den kinetischen Parametern der Pyr-Inhibierung verdeutlicht die große Variation die Wichtigkeit der gewählten Epimerase.

Folgende Effekte des Drucks auf die kinetischen Parameter konnten festgestellt werden: Zum einen stieg die Michaelis-Menten-Konstante für ManNAc, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit der Rückreaktion sank. Zum anderen stieg die maximale Reaktionsrate. Aus diesem Grund konnte kein allgemeiner Schluss für einen vor- oder nachteilhaften Effekt von Druck auf die kinetischen Parameter gefolgert.

Zusammenfassung

Bei der Untersuchung der kinetischen Parameter der Epimerase wurde festgestellt, dass Hin- und Rückreaktion nur geringfügig durch Druck beeinflusst wurden. Bei der Inhibierung durch Pyr wurde festgestellt, dass die Inhibierungskonstante durch Druck reduziert und so die Inhibierung verstärkt wurde. Aus den Daten wurde die Änderung des molaren Volumens für die Reaktion



zu $(-12,9 \pm 3,0)$ mL/mol berechnet.

4.5.2 Gleichgewicht

Da in den vorangegangenen Abschnitten die Gleichgewichtskonstante anstelle des Gleichgewichtsumsatzes verwendet wurde, wurde diese auch bei der Vermessung des Gleichgewichts der Epimerase verwendet. Da es sich um eine 1-zu-1-Reaktion handelte, kann die Gleichgewichtskonstante ohne weitere Kenntnisse zu dem Gleichgewichtsumsatz überführt werden:

$$K_{Epi} = \frac{X_{GGW}}{1 - X_{GGW}} \quad (4.11a)$$

$$X_{GGW} = \frac{K_{Epi}}{1 + K_{Epi}} \quad (4.11b)$$

Die Gleichgewichtskonstante wurde bei verschiedenen Drücken gemessen (Abbildung 4.29) und zeigte einen leichten Anstieg mit dem Druck.

In Abschnitt 4.5.1 wurden bereits Daten für die Lage des Gleichgewichts bei Umgebungsdruck aufgeführt. Die Literaturwerte wiesen Werte von 0,201 bis 0,262 auf und waren deshalb in guter Übereinstimmung mit den direkt berechneten Gleichgewichtskonstanten.

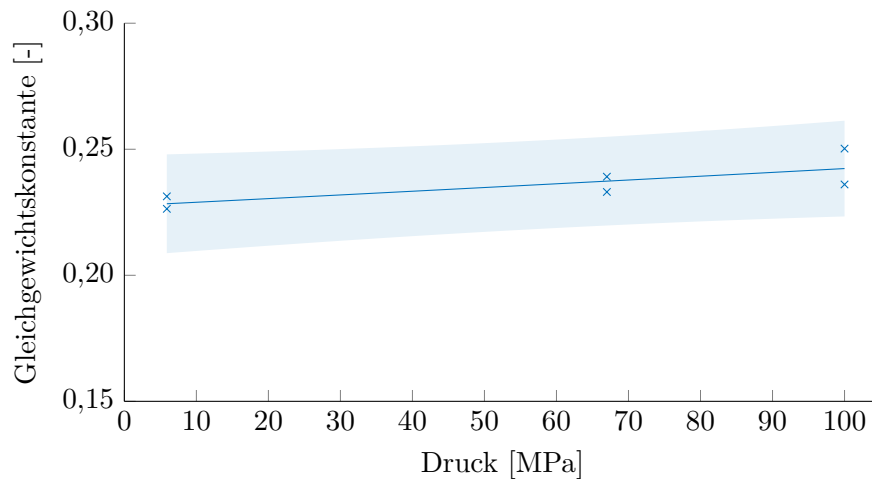


Abbildung 4.29: Bestimmte Gleichgewichtskonstante der Epimerase. Verwendet wurde der Umlaufreaktor mit 0,21 mL Reaktorvolumen. 2,1 mL Volumen im Pufferbehälter. Startkonzentrationen: 200 mM GlcNAc, 1 mM ATP und 1 mM MgCl₂. 37 °C, Pumprate: 1,5 mL/min, 10 mM KP_i-Puffer pH 8, 62,6 mg Epimerase-Träger-Präparat.

Der angegebene Wert für die Gleichgewichtskonstante entspricht einem Gleichgewichtsumsatz von 0,21 bis 0,23. Aus den eigenen kinetischen Daten mittels der Haldane-Beziehung wurden Gleichgewichtskonstanten von 0,17 bis 0,23 berechnet, welche konsistent mit den direkten Messungen des Gleichgewichts waren.

Der Zusammenhang der Gleichgewichtskonstante zum Druck war, verglichen mit den Ergebnissen der Aldolase, vernachlässigbar und kleiner als die Unsicherheit der Messung. Mittels Regression wurde ein exponentieller Zusammenhang angenommen (siehe Abschnitt 3.5.1) und eine Volumenänderung durch die Epimerisierung zu $(-1,6 \pm 3,8)$ mL/mol bestimmt. Die Gleichgewichtskonstante bei dem Referenzdruck (0 MPa) wurde zu $0,23 \pm 0,01$ bestimmt. Die Regression wies folgende Kennzahlen auf: $R^2 = 0,5937$ und $RMSE = 5,8 \cdot 10^{-3}$. Da es sich bei der Epimerisierung um eine 1-zu-1-Reaktion handelt und die Struktur von Substrat (GlcNAc) und Produkt (ManNAc) sehr ähnlich ist, ist die Tatsache, dass es während der Reaktion keine Änderung des molaren Volumens gibt, plausibel. Zu einem war dieser Wert um eine Größenordnungen kleiner als die Volumenänderung der Aldolase. Zum anderen zeigte sich durch das hohe Konfidenzintervall (3,8 mL/mol), dass die Messunsicherheit größer als der Einfluss des Drucks war. Andersen und Grønlund untersuchten die Lage des Reaktionsgleichgewichts zwischen α -Glc und β -Glc und konnten keinen Einfluss von Drücken bis 120 MPa feststellen [92]. Da in dieser Arbeit die Acetyl-Gruppe die Position ändert, wurde dieses Ergebnis mit dem von Andersen und Grønlund als konsistent erachtet.

Dass sich die Lösung der verschiedenen Versuche im Gleichgewicht (GGW) befand und nicht die Enzyme deaktiviert waren, wurde dadurch bestätigt, dass dasselbe Festbett für verschiedene Versuche verwendet wurde. Wären die Enzyme deaktiviert gewesen, wäre der Umsatz bei dem nachfolgendem Versuch signifikant kleiner ausgefallen.

4 Ergebnisse

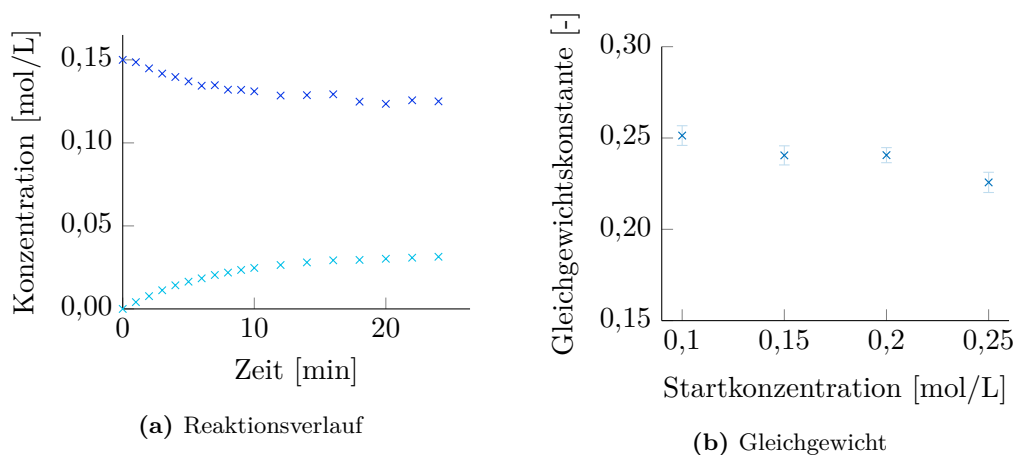


Abbildung 4.30: Epimerase: (a) Reaktionsverlauf mit freien Enzymen (Start 150 mM GlcNAc) und (b) Vermessene Gleichgewichtskonstante bei Variation der Startkonzentration von GlcNAc. 0,1 g_E/L, 50 mM KP_i-Puffer pH 8, 37 °C, 1 mM ATP und 1 mM MgCl₂, 500 rpm.

Parallel zu den Versuchen mit immobilisierter Epimerase wurde Experimente mit freier Epimerase in Reaktionsgefäßen durchgeführt [182]. Hierbei wurde zum einen die Startkonzentration von GlcNAc variiert, als auch Pyr als Inhibitor zugegeben. Die Reaktion befand sich nach ca. 15 min im Gleichgewicht (exemplarisch Abbildung 4.30a) und die berechneten Gleichgewichtskonstanten sind in Abbildung 4.30b wiedergegeben.

Unter Berücksichtigung der Fehlerbalken und des Konfidenzintervalls stimmen die Gleichgewichtskonstanten erwartungsgemäß von immobilisierten und freien Enzymen überein.

4.5.3 Zusammenfassung

Für die Epimerase wurden wenig signifikante Einflüsse von dem Druck auf Reaktionskinetik oder die Lage des Gleichgewichts festgestellt. Die kinetischen Parameter der Hinreaktion wurden nicht beeinflusst. Bei der Rückreaktion hat sich die Michaelis-Menten-Konstante von 16 mM auf 24 mM erhöht. Die Lage des Gleichgewichts wurde unsignifikant erhöht, wobei die Unsicherheit der berechneten Parameter höher war als die Erhöhung. Zwischen den kinetischen Daten und der Lage des Gleichgewichts bestand gute Konsistenz (Haldane-Beziehung).

Es konnte ein signifikanter Einfluss des Drucks auf die Inhibierung durch Pyr gezeigt werden. Hochdruck erhöhte die Affinität zwischen Pyr und der Epimerase und es wurde eine Änderung des molaren Volumens um $(-12,9 \pm 3,0)$ mL/mol berechnet. Für die untersuchte Reaktion stellt dies einen Nachteil dar, da somit die Inhibierung verstärkt wird.

Verschiedene Gruppen arbeiten daran eine Epimerase zu finden, welche weniger stark durch Pyr inhibiert wird [49]. Sollte die Inhibierung reduziert werden können, würde der Nachteil des Einflusses von Druck auf die verwendeten Epimerase verringert werden.

4.6 Gekoppeltes System im Umlaufreaktor

Wie von verschiedenen Arbeitsgruppen in der Literatur beschrieben, wurden auch in dieser Arbeit beide Enzyme zeitgleich in einer Enzymkaskade verwendet, um Neu5Ac aus GlcNAc und Pyr herzustellen. Sowohl kinetische, als auch Gleichgewichtsstudien des gesamten Systems bauen auf den Ergebnissen der einzeln untersuchten Enzyme auf. Dabei konnten die thermodynamischen Parameter (K_0 und ΔV) der Einzelreaktionen bei der Verwendung beider Enzyme berechnet und mit den zuvor erhaltenen verglichen werden.

Zur mathematischen Beschreibung der Konzentrationsänderungen mit der Zeit wurde ein System aus Differentialgleichungen verwendet, wobei angenommen wurde, dass der Umlaufreaktor homogen durchmischt war.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} c_G \\ c_M \\ c_P \\ c_N \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 1 & -1 \\ 0 & -1 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_{Epi}(c_G, c_M, c_P, c_N) \\ v_{Aldol}(c_G, c_M, c_P, c_N) \end{pmatrix} \quad (4.12)$$

Hierbei steht v_{Epi} und v_{Aldol} für die Reaktionsraten der Epimerase beziehungsweise Aldolase (in mol/m³/s). Ausgeschrieben lautet das Gleichungssystem:

$$\frac{dc_G}{dt} = -v_{Epi}(c_G, c_M, c_P, c_N) \quad (4.13a)$$

$$\frac{dc_M}{dt} = +v_{Epi}(c_G, c_M, c_P, c_N) - v_{Aldol}(c_G, c_M, c_P, c_N) \quad (4.13b)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = -v_{Aldol}(c_G, c_M, c_P, c_N) \quad (4.13c)$$

$$\frac{dc_N}{dt} = +v_{Aldol}(c_G, c_M, c_P, c_N) \quad (4.13d)$$

Für die gekoppelte Reaktion stellt ManNAc ein Zwischenprodukt dar. Aus diesem Grund wurde auch der Einfluss von Druck auf die Selektivität der Gesamtreaktion betrachtet. Weitere Nebenprodukte wurden nicht festgestellt, da die Summe der Konzentrationen der vermessenen Spezies konstant war.

Da die Reaktion bis zu höheren Umsätzen durchgeführt werden sollte, wurde der Umlaufreaktor verwendet. Dabei wurden die Proben des Reaktionsmediums aus dem temperierten Pufferbehälter entnommen. Parallel zu Umlaufversuchen wurde ein Teil der Reaktionslösung in ein Reaktionsgefäß überführt und sowohl bei Raum, als auch bei Reaktionstemperatur gelagert. In diesen Parallelversuchen wurde kein Umsatz festgestellt.

In Abschnitt 4.6.1 wurden die gemessenen Konzentration-Zeit-Verläufe mit Simulationen verglichen. Der Verlauf ergab sich aus der Lösung der DGL (Gleichung (4.12)), wobei die kinetischen Parameter verwendet wurden, die zuvor bei den Enzymen separat bestimmt wurden.

4.6.1 Reaktionsfortschritt

Ein Festbett, in welchem beide Enzyme vorhanden sind, bietet den Vorteil, dass produziertes ManNAc direkt von der Aldolase umgesetzt werden kann. Durch die hohe Durchmischung im System (Abschnitt 4.2.5) wurde keine signifikanter Unterschied erwartet, ob beide Enzym-Präparate in einem oder separat in zwei Festbettreaktoren gefüllt wurden. Um diese Überlegung zu überprüfen, wurde ein Versuch mit einem einzigem Festbett bestehend aus beiden Enzym-Präparaten und ein anderer Versuch mit zwei Festbettreaktoren durchgeführt.

Um den Gültigkeitsbereich der Simulation zu prüfen, wurde ein Experiment mit geringen Enzym-Mengen durchgeführt, um den Reaktionsfortschritt in einer hohen zeitlichen Auflösung vermessen zu können. In dem anderen Experiment wurden die Enzym-Mengen so weit erhöht, dass diese über der Menge lag, welche bei der Bestimmung der kinetischen Parameter benutzt wurde.

Abbildung 4.31 zeigt den gemessenen und simulierten Verlauf an Neu5Ac bei niedriger Enzym-Menge und einem einzelnen Festbettreaktor. Das Festbett im Reaktor wurde hergestellt, indem die Enzym-Präparat-Lösungen separat in einer Spritze aufgezogen wurden. Nach Sedimentation wurden die gewünschten Volumen an Präparat durch händisches Verrühren vermischt, bis es homogen durchgemischt war (die Enzym-Träger-Präparate waren farblich unterscheidbar). Das eingesetzte Volumenverhältnis der Präparate (1:9(vEpi/vAldol)) wurde über die erwarteten spezifischen Aktivitäten festgelegt. Aufgrund des geringen Gleichgewichtsumsatzes der Epimerase von 0,18 % betrug die maximale ManNAc-Konzentration 56 mM. Bei einer Pyr-Konzentration von 300 mM ergibt sich die spezifische Aktivität zu $102 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$. Dieser steht eine spezifische Aktivität des Epimerase-Präparat von $800 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{Tr}}$ gegenüber, wenn Inhibierungen vernachlässigt werden. Da der Gleichgewichtsumsatz der Epimerisierung niedriger als der der Aldol-Reaktion ist, wurde erwartet, dass dieser schneller erreicht wird. Aus diesem Grund wurde das Enzym-Präparat-Verhältnis auf 1:9 erhöht.

Um das optimale Verhältnis der Enzym-Präparate zu berechnen, wurde parallel ein Matlab-Skript (Anhang A.5.7) erstellt, welches die gesamte Kinetik (Inhibierung und Rückreaktion) berücksichtigt. Hierbei wird die Zeit minimiert, welche benötigt wird, um einen geforderten Umsatz relativ zum Gleichgewichtsumsatz (z.B. 90 % des Gleichgewichtsumsatzes) zu erreichen.

Da die Konzentrationen zu Beginn in guter Übereinstimmung waren, wurden die kinetischen Werte der Hinreaktionen als bestätigt angesehen. Die Lage des Gleichgewichts wurde durch die Simulation unterschätzt. Potentiell wurden die Rückreaktionen in den isolierten Untersuchungen überschätzt. Gründe könnten sein, dass die Rückreaktion bei höherer KPi -Pufferkonzentration vermessen wurde (200 mM und NaOH-Zugabe im Gegensatz zu 100 mM). Zudem waren die Konfidenzintervalle signifikant, welches eine Unsicherheit bei der Simulation bedeutete.

In dem anderen Versuch wurden die eingesetzten Mengen an Enzymen deutlich erhöht (vorher insgesamt 94,4 mg Gesamtmenge an Enzym-Präparat zu 236,8 mg). Hiermit wurde überprüft, dass die berechneten kinetischen Parameter und kinetischen Gleichungen auch außerhalb der Reaktionsbedingungen gültig sind, unter welchen sie vermessen wurden.

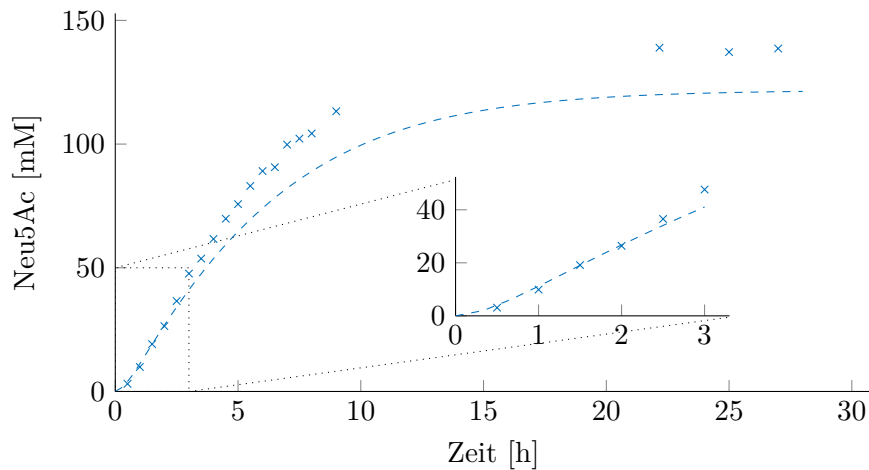


Abbildung 4.31: Konzentrationsverlauf von Neu5Ac bei gekoppelter Reaktion und $(8,7 \pm 0,4)$ MPa mit Simulation. Beide immobilisierten Enzyme wurden in einem Festbett vermisch (1:9(vEpi/vAldol)) 94,4 mg gesamt. Startkonzentrationen: 300 mM GlcNAc und Pyr sowie 1 mM ATP und 1 mM $MgCl_2$, $40^\circ C$, Reaktorvolumen 0,35 mL, 100 mM KP_i -Puffer (7,50). Reaktionsvolumen 7,5 mL, Flussrate 2 mL/min.

Zudem wurde der Druck auf 110 MPa eingestellt um die Qualität der Simulation bei Hochdruck zu untersuchen. Zunächst sollte sichergestellt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Simulation mit experimentellen Daten übereinstimmt. Abbildung 4.32 stellt diese Ergebnisse dar und es wurde eine geringe Überschätzung durch die Simulation festgestellt.

Um die Simulation bei hohen Enzym-Konzentrationen auch bei Niedrigdruck zu validieren, wurde derselbe Aufbau erneut verwendet (Abbildung 4.33). Hierbei fiel auf, dass der simulierte Reaktionsfortschritt deutlich schneller als der gemessene war (durchgezogene Linie). Da in Abbildung 4.31 die Reaktionsrate von Simulation und Experiment übereinstimmte, wurde geschlossen, dass eine Deaktivierung der Enzyme stattfand. Aus diesem Grund wurde die Simulation mit einer reduzierten Aktivität beider Enzyme erneut mit 66 % Restaktivität durchgeführt (gestrichelte Linie). Um eine auskräftige Deaktivierungskonstante der Enzyme zu bestimmen, müssten die gleichen Versuche mehrfach und nach festgelegter Zeit wiederholt werden um die Restaktivität zu vergleichen.

Mit der verringerten Aktivität wurde eine Übereinstimmung von Experiment und Simulation erhalten. Es fiel auf, dass bei der Datenverarbeitung der Faktor 0,66 verwendet wurde. Dieser ist identisch zu dem Faktor, welche bei der Berechnung der Reaktionsrate verwendet wurde (Gleichung (4.4)). Eine Überschätzung der Reaktionsrate in vorherigen Experimenten wurde ausgeschlossen, da sonst die Simulation von Abbildung 4.31 deutlich reduzierte Reaktionsraten aufweisen müsste.

Der gefundene Unterschied des Reaktionsfortschritts wird als signifikant betrachtet, da sämtliche gemessenen Konzentrationen bei Hochdruck höher waren als die zur entsprechenden Zeit entnommenen Konzentrationen unter Niedrigdruck. Falls es keinen

4 Ergebnisse

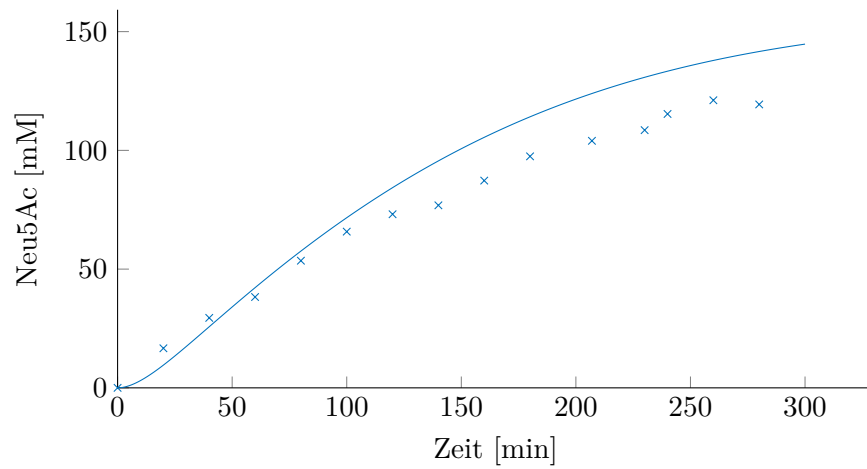


Abbildung 4.32: Konzentrationsverlauf im Umlaufreaktor mit Simulation aus kinetischen Parametern. ($110,2 \pm 0,5$) MPa. Bedingungen: Reaktorvolumen: 0,21 mL mit 57 mg Epimerase-Träger-Präparat, 0,7 mL mit 179,8 mg Aldolase-Träger-Präparat, 40 °C, Startkonzentrationen: 300 mM GlcNAc und Pyr sowie 1 mM ATP und 1 mM MgCl_2 , 100 mM KP_i -Puffer bei einem pH-Wert von 7,5, Reaktionsvolumen 8,2 mL, Flussrate 1,4 mL/min

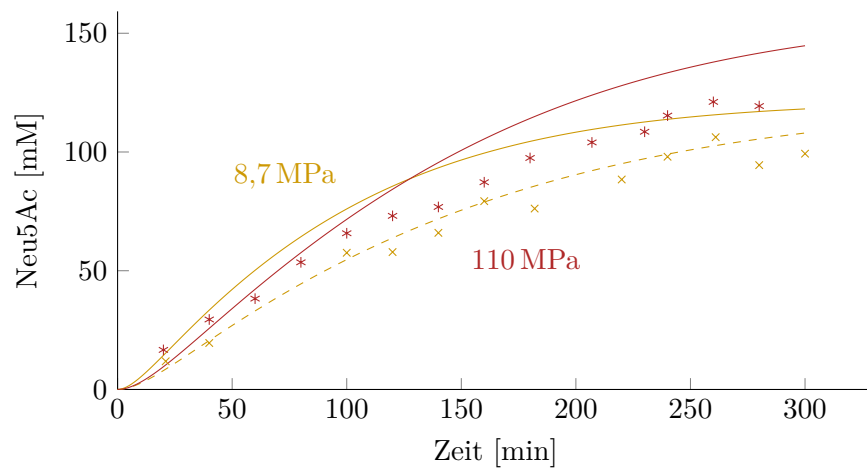


Abbildung 4.33: Konzentrationsverläufe von Neu5Ac bei Niedrig- und Hochdruck. Die durchgezogenen Linien wurden mittels der Simulationen berechnet. Die gestrichelte Linie ist das Ergebnis der Simulation mit 66 % der aktiven Enzyme.

4.6 Gekoppeltes System im Umlaufreaktor

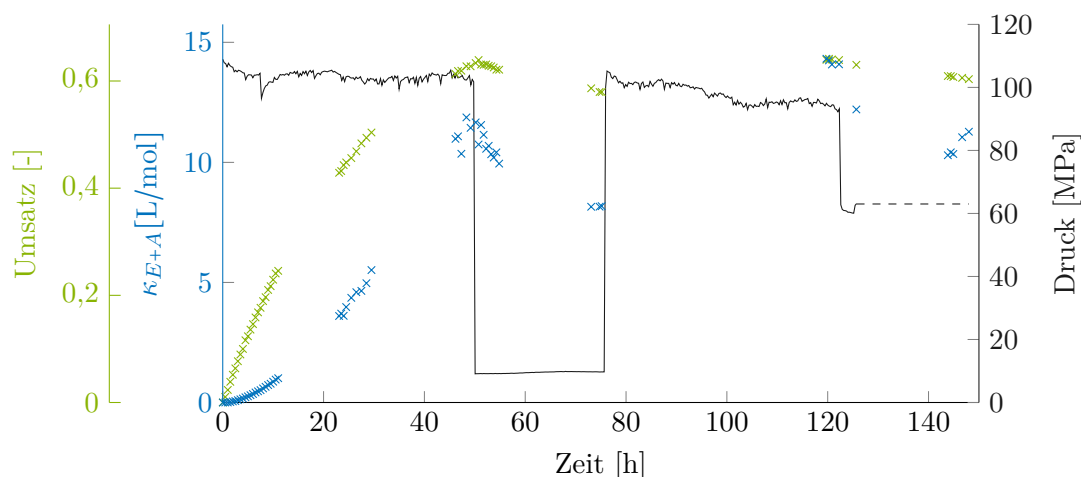


Abbildung 4.34: Reaktantenverhältnis (κ_{E+A}) und Umsatz bei einem Langzeitversuch der gekoppelten Reaktion mit Druckänderungen nach Erreichen des Gleichgewichts. Bedingungen: Reaktorvolumen: 0,35 mL, 40 °C, 300 mM GlcNAc, 300 mM Pyr, 1 mM ATP und 1 mM $MgCl_2$, beide immobilisierten Enzyme wurden in einem Festbett vermisch (1:9(vEpi/vAldo)) 85,4 mg gesamt, Flussrate 2 mL/min, 100 mM KP_i -Puffer bei einem pH-Wert von 7,5.

signifikanten Unterschied gegeben hätten, wäre zu erwarten gewesen, dass die höhere Konzentration zur Hälfte unter Hochdruck und zur Hälfte unter Niederdruck auftritt.

Verschiedene Effekte, welche zu einer Deaktivierung führten, waren denkbar. Sie könnte durch eine Variation im pH-Wert hervorgerufen worden sein (entweder aufgrund von erhöhten Neu5Ac-Konzentrationen oder des Drucks). Da in vergleichbaren Experimenten 149 mM Neu5Ac produziert wurde und der pH-Wert bei diesen 7,47 betrug, wurde eine Änderung ausgeschlossen. Eine Reduktion des pH-Wertes aufgrund des Drucks wurde auch ausgeschlossen, da dieser Effekt bei vorherigen Ergebnissen aufgefallen wäre (zum Beispiel bei der Messung der Kinetik: Hier wurden keine irreversiblen Änderungen festgestellt, da die Substratkonzentrationen randomisiert wurden). Zuletzt war auch eine Deaktivierung aufgrund der Zeit denkbar. Dies würde bedeuten, dass die Aktivität der Enzyme innerhalb von fünf Stunden um 33 % sank. Dieser Wert entspricht einer Halbwertszeit von 8,5 h. Alternativ war auch ein direkter Effekt durch Hochdruck denkbar.

Um diese These zu überprüfen wurde ein mehrtägiger Versuch unter Hochdruck gestartet und der Druck nach zwei Tagen reduziert. Wenn die Aktivität innerhalb fünf Stunden um 33 % sinken würde, wären nach 48 h nur noch 2 % Restaktivität vorhanden. Als Resultat von Druckänderungen sind sich ändernde Konzentrationen zu erwarten (Prinzip von Le Chatelier). Da bei den Untersuchungen der Aldolase signifikante Druckeinflüsse festgestellt wurden, wurde auch beim gekoppelten System ein Einfluss von Druck erwartet. Wenn die Restaktivität nur 2 % beträgt, wird sich das neue Gleichgewicht sehr langsam einstellen. Abbildung 4.34 stellt den gemessenen Verlauf des Umsatzes, des Reaktantenverhältnisses sowie den Druck dar.

Aufgrund der hohen Reaktionszeiten wurde aus diesem Versuch zudem die Lage

4 Ergebnisse

Tabelle 4.7: Gleichgewichtsdaten der gekoppelten Reaktion: Umsatz, Selektivität und Ausbeute bei verschiedenen Drücken. Zum Vergleich wurden die Gleichgewichtskonstante der zuvor separat bestimmten Reaktionsschritte multipliziert.

	Wert		
	(9,61 ± 0,19) MPa	60,8 MPa	(94,96 ± 0,60) MPa
K_{ges} [L/mol]	8,2	11,2	14,2
X	0,58	0,60	0,64
S	0,82	0,83	0,83
Y	0,48	0,50	0,54
$K_{Epi} \cdot K_{Aldol}$ [L/mol]	4,8	7,0	8,6

des Gleichgewichtes bei verschiedenen Drücken berechnet. Der Druck wurde so lange auf einem Niveau gehalten, bis die Konzentrationen keine Änderungen mit der Zeit aufwiesen. Da sich die Werte für die Gleichgewichtskonstante und auch die Umsätze der gesamten Reaktion auch nach 80 h als Resultat von Druckvariationen änderten, wurde eine Deaktivierung der Enzyme (33%/5h) aufgrund von Hochdruck ausgeschlossen.

4.6.2 Gleichgewicht

Die Gleichgewichtskonstanten, welche mittels der Ergebnisse aus Abbildung 4.34 berechnet wurden, wurden in Tabelle 4.7 festgehalten. Die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion wurde mittels Gleichung (3.46) bestimmt. Gleichzeitig zu dem Einfluss von Druck auf K_{ges} konnte auch der Einfluss von Druck auf die Gleichgewichtskonstanten der Einzelreaktionen bestimmt werden, indem die entsprechenden Reaktanten verwendet wurden.

Da eine Abhängigkeit der gekoppelten Reaktion vom Druck festgestellt wurde, wurden weitere Versuche bei Niedrig- und Hochdruck durchgeführt, welche in Abbildung 4.35 dargestellt wurden. Bei denen mit einem Plus markierten Messwerten wurde das System zuvor unter Hochdruck gesetzt und die Gleichgewichtskonstante war entsprechend deutlich erhöht. Mit 8,1 L/mol waren diese Messwerte deutlich höher als andere unter vergleichbaren Bedingungen. Deshalb wurde vermutet, dass das Gleichgewicht unter Niedrigdruck noch nicht erreicht war.

Bei den mit einem Stern gekennzeichneten Messwerten betrug die Gleichgewichtskonstante der Aldolase 37 L/mol bei Niedrigdruck. Da dieser Wert deutlich über den einzeln gemessenen Werten der Aldolase lag und zudem die Gleichgewichtskonstante der Aldolase in isolierten Versuchen von 40 L/mol (Hochdruck) auf 20 L/mol (Niedrigdruck) abfiel, wurde von einem Messfehler ausgegangen.

Die aus den Ergebnissen von Abbildung 4.35 berechneten thermodynamischen Größen (K_0 und ΔV) der Einzel- und Gesamtreaktion wurden in Tabelle 4.8 festgehalten.

4.6 Gekoppeltes System im Umlaufreaktor

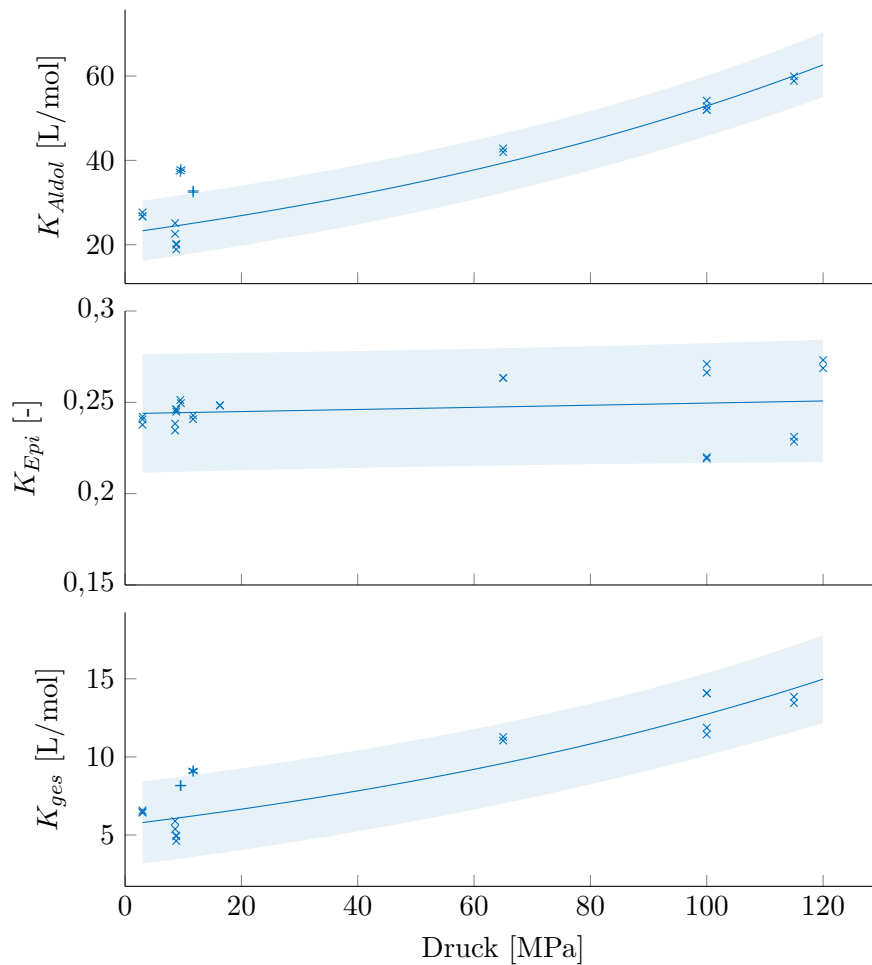


Abbildung 4.35: Erhaltene Werte für die Gleichgewichtskonstante der Aldol-Reaktion, Epimerisierung und der Gesamtreaktion. Insgesamt wurden sechs Versuche durchgeführt, wobei verschiedene Startkonzentrationen (10 mM bis 500 mM) und Mengen an Enzym (Epimerase: 9 mg bis 57 mg Aldolase: 85 mg bis 180 mg) verwendet wurden. Als Ausreißer deklarierte Punkte wurden mit einem Stern und Plus gekennzeichnet. Berechnete thermodynamische Parameter wurden in Tabelle 4.8 aufgelistet. Flussrate 1,5 mL/min bis 2 mL/min, 100 mM KP_i -Puffer bei einem pH-Wert von 7,5.

Tabelle 4.8: Berechnete thermodynamische Größen aus der gekoppelten Reaktion (Abbildung 4.35).

	K_0	ΔV [mL/mol]
Aldol-Reaktion	$(22,7 \pm 2,3)$ L/mol	$-22,0 \pm 5,7$
Epimerisierung	$0,24 \pm 0,01$	$-0,6 \pm 2,9$
Gekoppelt	$(5,7 \pm 0,8)$ L/mol	$-21,1 \pm 8,5$

4 Ergebnisse

Die aus der gekoppelten Reaktion berechneten Werte K_0 und ΔV für die Aldolase und Epimerase wiesen die gleiche Größenordnung wie die der isoliert bestimmten Parameter auf.

Thermodynamisch muss die Volumensänderung der Reaktionssequenz der Summe der Volumensänderungen der Einzelreaktionen entsprechen, da diese über die molare Volumen der Reaktanten berechnet wird (vergleiche Gleichung (5.1)). Innerhalb der Ergebnisse der Messreihe von Tabelle 4.8 sind die Ergebnisse konsistent.

Für die gekoppelte Reaktion wurden verschiedene Gleichgewichtskonstanten in der Literatur veröffentlicht: 5,90 L/mol [41] und $(7,12 \pm 3,25)$ L/mol [42]. Diese Werte stimmen mit dem gemessenen Wert von $(5,7 \pm 0,8)$ L/mol überein.

Eine Erhöhung der Gleichgewichtskonstante von 5,7 L/mol auf 14 L/mol würde bei einem Substratverhältnis von 1 und einer Startkonzentration von 0,3 mol/L eine Veränderung des Gleichgewichtsumsatzes von 47 % auf 62 % bedeuten.

Die Wirtschaftlichkeit dieser Steigerung ist in Abschnitt 5.3.1 diskutiert.

Es fällt auf, dass die Aldolase in der gekoppelten Reaktion scheinbar sensitiver gegenüber Druck war. Das zeigte sich sowohl durch höhere Werte für K_{Aldol} bei Hochdruck als auch durch eine größere Reduktion des molaren Volumens. Bei der gekoppelten Reaktion betrug die Gleichgewichtskonstante der Aldol-Reaktion bis zu 59,9 L/mol. Bei der einzeln untersuchten Reaktion wurden Werte bis zu 45,2 L/mol berechnet. Die Volumenänderung der Aldol-Reaktion in dieser Messreihe wurde zu $(-22,0 \pm 5,7)$ mL/mol und bei der ausschließlichen Verwendung zu $(-16,0 \pm 1,2)$ mL/mol bestimmt. Es besteht die Möglichkeit, dass bei der isolierten Untersuchung das Gleichgewicht noch nicht vollständig erreicht war und so die bestimmten Werte für die Gleichgewichtskonstante systematisch geringer berechnet wurden.

Bei der Epimerisierung sind die Ergebnisse der Einzeluntersuchungen und Ergebnisse aus der gekoppelten Reaktion konsistent. Hier betrug K_0 $0,23 \pm 0,01$ (einzeln) und $0,24 \pm 0,01$ (gekoppelt). Die Änderung des molaren Volumens war $(-1,6 \pm 3,8)$ mL/mol (einzeln) und $(-0,6 \pm 2,9)$ mL/mol (gekoppelt).

4.6.3 Zusammenfassung

Die isoliert untersuchten Enzyme konnten sowohl in einem gemischten Festbett, als auch in zwei individuellen Festbettreaktoren verwendet werden um Neu5Ac aus GlcNAc und Pyr zu produzieren. Hierbei wurde der Umlaufreaktor wie ein Satzreaktor bei verschiedenen Drücken verwendet um den Reaktionsfortschritt zu verfolgen.

Simulationen der Reaktionskinetik waren vergleichbar mit gemessenen Produktkonzentrationen. Die Lage des Gleichgewichts wurde von der Simulation nicht zuverlässig berechnet, was mit fehlenden oder fehlerhaften Daten der Rückreaktion der Aldolase begründet wurde.

Die aus der gekoppelten Reaktion bestimmten Daten zum Gleichgewicht der Einzelreaktionen wiesen vergleichbare Größenordnungen zu den isoliert berechneten Werten auf (z.B. $(-16,0 \pm 1,2)$ mL/mol aus der isolieren und $(-21,1 \pm 8,5)$ mL/mol aus der gekoppelten Reaktion).

Somit konnten die Lage des Gleichgewichts der gesamten Reaktionssequenz positiv durch Druck beeinflusst werden.

4.7 Machbarkeitsnachweis: kontinuierlich betriebener Umlaufreaktor

Der kontinuierliche Betrieb in der Biotechnologie wurde von Woodley als essentiell beschrieben, um die Entwicklung voranzutreiben [2]. Um diesem Vorschlag nachzukommen, wurde der Umlaufreaktor (welcher einem Satzreaktor ähnelt) zu einem kontinuierlich arbeitendem Reaktor umgebaut, indem frische Substratlösung (GlcNAc und Pyr) in den Pufferbehälter gefördert und zeitgleich Reaktionsmedium herausgepumpt wurde (Abbildung 4.36). Da im Pufferbehälter Umgebungsdruck herrscht, konnten Spritzenpumpen verwendet werden, welche nicht für Hochdruckanwendungen entwickelt wurden. Mittels der Spritzenpumpen wurde die Flussrate durch den Umlaufreaktor eingestellt und so die Reaktionszeit variiert, während der Druck im Reaktor 88 MPa betrug.

Das System wurde zunächst auf Dichtigkeit überprüft, indem der Umlaufreaktor 10 min ($0,5 \tau$) betrieben wurde. Anschließend wurden die Spritzenpumpen eingeschaltet und der kontinuierliche Betrieb aufgenommen. Zeitpunkt „0“ wurde mit dem Start des kontinuierlichen Betriebs definiert, was dazu führte, dass zu diesem Zeitpunkt bereits ein geringer Umsatz vorhanden war.

Der Fehler der Massenbilanz von GlcNAc, ManNAc und Neu5Ac betrug höchstens 5,5% und auch mikrobielles Wachstum in dem Zulauf wurde ausgeschlossen, indem die Konzentrationen des Zulaufs zum Ende des Experiments erneut vermessen wurden (GlcNAc zu Beginn 287 mM und 290 mM am Ende, Pyr zu Beginn 290 mM und 300 mM am Ende).

Bei einer eingestellten Verweilzeit von 10 min wurde alle 10 min eine Probe entnommen (bei 20 min entsprechend alle 20 min). Nach fünf Verweilzeiten wurden die Konzentrationen in Duplikaten bestimmt und beide Ergebnisse in Abbildung 4.37a aufgetragen. Abschließend wurde die Flussrate deutlich reduziert und der Reaktor kontinuierlich für 12 h betrieben (insgesamt 20 h Betrieb). Der Verlauf des Drucks wurde in Abbildung 4.37b

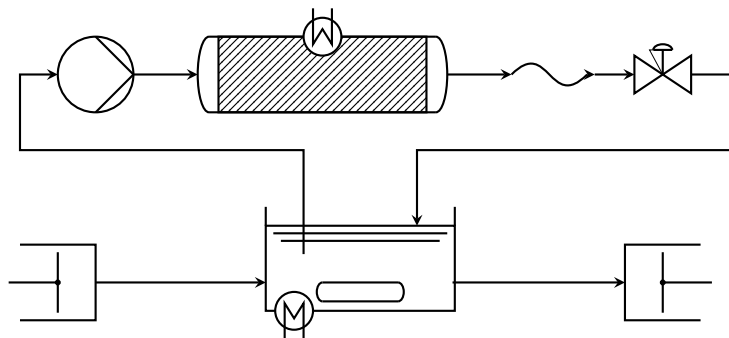


Abbildung 4.36: Kontinuierlich arbeitender Umlaufreaktor.

4 Ergebnisse

aufgezeichnet. Der Druck im System musste nicht reduziert werden um Lösungsmedium in eine Spritzenpumpe nachzufüllen oder zu entnehmen, da weiterhin Medium gefördert wurde. Hierdurch ergab sich ein kontinuierlich hoher Druck.

Es fiel auf, dass die Konzentrationen von GlcNAc und Pyr zu Ende des Versuchs um knapp 3% höher als zu Beginn waren. Zudem war die Summe der Konzentrationen von GlcNAc, ManNAc und Neu5Ac 275 mM bis 280 mM und somit knapp 3% niedriger als die GlcNAc-Konzentration des Zulaufs. Es ist denkbar, dass der Zulauf nicht homogen durchmischt und so die GlcNAc-Konzentrationen am Boden des Reaktors erhöht war. Solche Inhomogenitäten konnten auch bei anderen Lösungen optisch beobachtet werden, da der Brechungsindex aufgrund der GlcNAc-Konzentration verändert wurde.

Der Umsatz wurde parallel mittels der bestimmten Reaktionskinetik berechnet, indem die Massenbilanzen des Reaktors (Gleichung (4.14)) numerisch nach der austretenden Konzentration gelöst wurde.

$$V_{Rea} \frac{d}{dt} \begin{pmatrix} c_G \\ c_M \\ c_P \\ c_N \end{pmatrix} = \dot{V} \cdot \mathbf{c}_{ein} - \dot{V} \cdot \mathbf{c}_{aus} + V_{Rea} \cdot \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 1 & -1 \\ 0 & -1 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_{Epi}(c_G, c_M, c_P, c_N) \\ v_{Aldol}(c_G, c_M, c_P, c_N) \end{pmatrix} = \mathbf{0} \quad (4.14)$$

Dabei sind \mathbf{c}_{ein} die Konzentrationen jeder Spezies im Eingangsstrom als Vektor (in mol/m³) und \mathbf{c}_{aus} entsprechend die Konzentrationen des Ausgangsstroms (in mol/m³). Um Gleichung (4.14) zu erhalten, wurde das System als stationär angenommen.

Exemplarisch sind die Bilanzen für ManNAc und Neu5Ac ausgeschrieben:

$$V_{Rea} \frac{dc_M}{dt} = \dot{V} \cdot c_{M,ein} - \dot{V} \cdot c_{M,aus} + V_{Rea} \cdot v_{Epi}(c_G, c_M, c_P, c_N) - V_{Rea} \cdot v_{Aldol}(c_G, c_M, c_P, c_N) \quad (4.15a)$$

$$V_{Rea} \frac{dc_N}{dt} = \dot{V} \cdot c_{N,ein} - \dot{V} \cdot c_{N,aus} + V_{Rea} \cdot v_{Aldol}(c_G, c_M, c_P, c_N) \quad (4.15b)$$

Die berechneten und gemessenen Umsätze, sowie die Raum-Zeit-Ausbeute sind in Tabelle 4.9 aufgeführt.

Tabelle 4.9: Ergebnisse zu Abbildung 4.37. Gemessenen und berechneten Umsätze sowie die RZA bei verschiedenen Volumenströmen. Der Umsatz wurde über GlcNAc berechnet. Bei 1 mL/min war die Konzentration von Neu5Ac unter der Detektionsgrenze und es wurde keine RZA berechnet.

Volumenstrom [mL/min]	RZA [g/d/L]	gem. Umsatz [%]	ber. Umsatz [%]
0,045	149	34	38
0,5	67	4	6,7
1		2	3,7

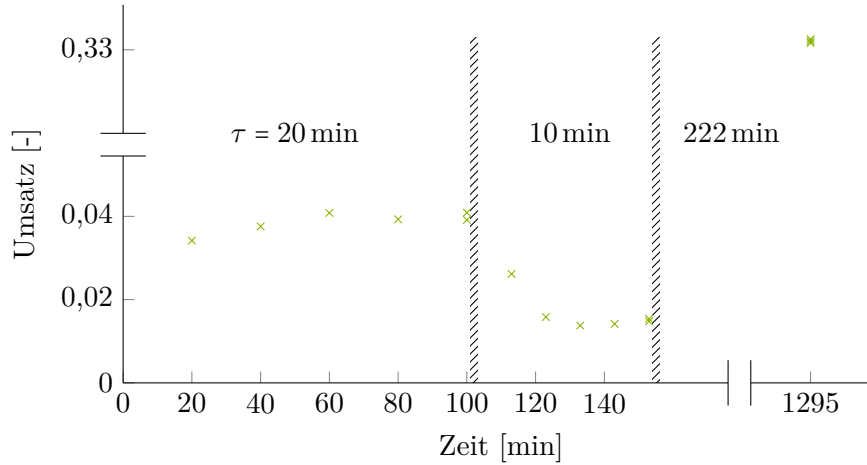
4.7 Machbarkeitsnachweis: kontinuierlich betriebener Umlaufreaktor

Um eine homogene Durchmischung zu gewährleisten sollte die Flussrate des Eingangstroms deutlich höher sein als die des Umlaufstroms. So ist bei Schlaufenreaktoren ab einem Rücklaufverhältnis von 10 mit stationären Bedingungen zu rechnen und ab einem Verhältnis von 20 einem Verhalten ähnlich zu einem kontinuierlich arbeitenden Rührkessel [183]. Da der Volumenstrom des Kreislaufs 2 mL/min betrug, wäre bis maximal 0,1 mL/mol eine homogene Durchmischung zu erwarten. Das bedeutet, dass bei 0,5 mL/min und 1 mL/min das Medium potentiell nicht homogen gemischt war. Eine Analyse der VZV des gesamten Reaktors könnte Aufschluss über die Durchmischung liefern.

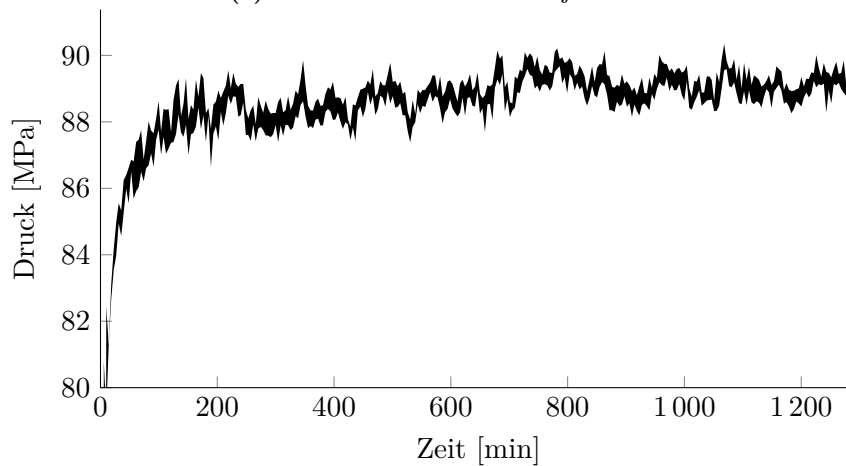
Qualitativ wurden folgende Beobachtungen zum Reaktorkonzept und die Ergebnisse gemacht:

- Es konnte gezeigt werden, dass reguläre Spritzenpumpen für die Verwendung des Hochdruckumlaufreaktors verwendet werden konnten während sich das Festbett unter Hochdruck (88 MPa) befand.
- Die Spritzenpumpen konnte neu befüllt werden, ohne dass der Druck des Festbettreaktors reduziert werden musste.
- Mit einer Reduzierung der Förderrate der Spritzenpumpen stieg der Umsatz, was auf die Erhöhung der Verweilzeit zurückgeführt wurde.
- Das System erreichte den stationären Betriebspunkt nach drei Verweilzeiten.
- Es wurde ein kontinuierlich arbeitendes Reaktorkonzept entwickelt werden, welches Studien unter Hochdruck ermöglicht.

4 Ergebnisse



(a) Vermessener Umsatz nach je einer Verweilzeit.



(b) Druckaufzeichnung

Abbildung 4.37: Gemessener Umsatz während der Versuchszeit. Verwendet wurden verschiedene Fördergeschwindigkeiten (0,5 mL/min, 1 mL/min und 0,045 mL/min) der Spritzenpumpe. Gesamtvolumen 10 mL, im Kreis geförderter Volumenstrom 2 mL/min, Substratlösung 290 mM GlcNAc und 290 mM Pyr, 40 °C, 100 mM KP_i -Puffer bei einem pH von 7,50, 1 mM ATP und 1 mM MgCl_2 , 50,6 mg Epimerase-Träger-Präparat in 0,21 mL, 258,1 mg Aldolase-Träger-Präparat in 0,70 mL. Der Messpunkt bei 1 295 min erfolgt als Triplikate. Zahlenwerte für die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) und Umsätze sind in Tabelle 4.9 aufgeführt.

5 Diskussion und Ausblick

Dieses Kapitel ist dreigeteilt. Zu Beginn werden die Reaktoraufbauten mit Vor- und Nachteilen beschrieben um potentielle systematische Fehler in den Messungen zu identifizieren. Anschließend werden die Messwerte dieser Arbeit hinsichtlich Konsistenz, Reproduzierbarkeit und systematischen Fehlern diskutiert. Abschließend wird mit einer Kosten-Nutzen-Analyse bewertet, inwiefern Hochdruck wirtschaftliche Vorteile bringen kann.

5.1 Experimenteller Aufbau

Die positiven Aspekte des entwickelten Hochdruckumlaufreaktors, sowie die Verwendung des Festbettreaktors wurden bereits in Kapitel 4 aufgeführt und werden an dieser Stellen kurz genannt.

Der Festbettreaktor ist für kinetische Messungen geeignet, da sehr kurze Verweilzeiten eingestellt werden können. Durch die eingebaute Mischkammer konnten zudem die Konzentrationen variiert werden. Verglichen mit einer kinetischen Messung in Satzreaktoren stellen diese Punkte einen Vorteil dar. Besonders ist dies ein Vorteil, wenn der Satzreaktor unter Druck stehen. Bei Hochdrucksatzreaktoren muss zur Vermessung der Konzentrationen entweder der Druck vollständig reduziert oder eine geeignete Echtzeit-Analytik etabliert werden.

Nachteilig ist, dass es nicht ohne Weiteres möglich ist, den Reaktionsfortschritt zu analysieren. Zwar kann der Volumenstrom reduziert werden um höhere Verweilzeiten zu erreichen, dies kann aber das Strömungsprofil verändern.

Das Befüllen des Reaktors wurde ohne weiteren apparativen Aufwand durchgeführt. Zwar wurden die produzierten Schüttungen mittels Verweilzeitverteilung (VZV) untersucht (und als ähnlich festgestellt, siehe Abschnitt 4.2.2), es ist jedoch möglich, dass die VZV eine Mittlung aller lokalen Eigenschaften des Festbetts darstellt. Diese würden dazu führen, dass lokale Unterschiede in der Schüttung global als vergleichbare Schüttung erscheinen.

Bei der Verwendung von Festbettreaktoren in dem Maßstab dieser Arbeit besteht die Gefahr von Randgängigkeit. Um diese zu vermeiden, muss der Radius des Reaktors deutlich größer als der Radius der Partikel sein. Durch die VZV konnte Randgängigkeit in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da die Verteilung unimodal war.

Die Kenntnis der VZV ist essentiell, da mit dieser die mittlere Verweilzeit des Fluids bestimmt wird und diese in kinetische Berechnungen eingeht. Ist diese Messung fehlerhaft, sind sämtliche Ergebnisse systematisch verzerrt und somit alle Reaktionsgeschwindigkeiten größer oder kleiner als die reale Geschwindigkeit. Sollte dies der Fall sein, wären die

berechneten Werte für v_{max} beziehungsweise $a_{sp,max}$ fehlerhaft. Sowohl die vermessenen Inhibierungs- und Michaelis-Menten-Konstanten als auch der Einfluss von Druck auf diese, würden von diesem Fehler nicht beeinflusst.

Es fällt auf, dass die Menge an Enzym-Träger-Präparat, welche in die Reaktoren gefüllt wurde, stark schwankt. Für das Epimerase-Träger-Präparat wurde eine Konzentration von 240 g/L bis 298 g/L und bei dem Aldolase-Träger-Präparat eine Konzentration von 256 g/L bis 389 g/L verwendet. Diese wurde über das Leervolumen des Reaktors und die eingesetzte Masse an Enzym-Träger-Präparat berechnet. Beim Öffnen des Reaktors nach den Messreihen fiel bei keiner auf, dass die Länge des Festbetts während des Versuches reduziert war. Der Reaktor war stets vollständig befüllt. Größere Hohlräume im Festbett werden dadurch ausgeschlossen, da das Festbett beim Packen mittels einer KP_1 -Pufferlösung komprimiert und gegebenenfalls mehr Enzym-Träger-Präparat nachgefüllt wurde. In Anbetracht der unterschiedlichen Mengen an Präparat muss die Aussage über ein vergleichbar gepacktes Festbett dennoch zu hinterfragt und erneut analysiert werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Partikel unterschiedlich stark zerkleinert wurden. Dabei kann das hergestellte Festbett eine höhere Dichte aufweisen, wenn die Partikel kleiner sind. Aus diesem Grund ist die Methodik der Zerkleinerung und Befüllung der Reaktoren zu standardisieren.

Folgende Aspekte stellten sich als Vorteile des Hochdruckumlaufreaktors heraus:

- Direkte Probenentnahme während im Reaktor Hochdruck herrscht
- Kontinuierliche Produktion/Synthese durch Umbau mittels zwei Pumpen möglich, welche nicht auf Hochdruck ausgelegt sind

Nachteilig ist jedoch, dass der Aufbau nicht direkt im Maßstab vergrößert werden kann. Da Kapillaren mit kleinen Innendurchmessern ($50\ \mu\text{m}$) verwendet wurden und der produzierte Druckverlust vom Volumenstrom abhängt, muss bei größeren geförderten Mengen untersucht werden, inwieweit dieses Vorgehen realisiert werden kann. Alternativ sind geeignete Rückdruckregler heranzuziehen.

Zudem müssen geeignete Pumpen verwendet werden. In dieser Arbeit wurde die Pumpe einer Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) eingesetzt, welche maximal 3 mL/min fördern kann. Pumpen mit größeren Volumenströmen (bei Hochdruck) dürfen dabei keine signifikanten Druckschwankungen erzeugen, da diese Enzyme schaden können. Rapider Druckaufbau und Entspannung werden in der Lebensmittelindustrie verwendet um Enzyme zu deaktivieren (vgl. Abschnitt 1.1.2).

5.2 Diskussion der Messergebnisse

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt ist das Zerkleinern der Partikel zu vereinheitlichen. Zudem ist die Partikelgrößenverteilung der zerkleinerten Partikel zu vermessen um sicherzustellen, dass bei allen Versuchsreihen vergleichbare und vernachlässigbare Diffusionseffekte vorliegen. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, dass die Enzyme direkt auf kleineren Partikeln immobilisiert werden, welche eine definierte Größenverteilung aufweisen.

Trotz nicht-standardisierter Methodik zur Zerkleinerung waren die vermessenen Reaktionsraten in dieser Arbeit konsistent. Dabei bildet die Untersuchung der Inhibierung der Epimerase durch Pyruvat (Pyr) eine Ausnahme, bei welcher die Reaktionsrate niedriger als bei vergleichbaren Experimenten war. Eine mögliche Erklärung besteht in unterschiedlichen Partikelgrößenverteilungen, wodurch Diffusionseffekte signifikant waren.

Ein weiterer Aspekt ist der Vergleich der kinetischen mit den thermodynamischen Daten mittels der Haldane-Beziehung. Es bestand Ähnlichkeit zwischen den direkt vermessenen Gleichgewichtskonstanten und mittels Haldane-Beziehung berechneten. Aufgrund der Konfidenzintervalle der kinetischen Parameter war das per Fehlerfortpflanzung berechnete Konfidenzintervall der berechneten Gleichgewichtskonstanten im Vergleich zum Wert groß (z.B. $(27,2 \pm 24,7)$ L/mol).

Eine Erhöhung der Anzahl der kinetischen Messungen sollte zu einer Reduktion der Messunsicherheit und zu einer Reduktion aller Konfidenzintervalle führen.

5.2.1 Berücksichtigte Messwerte

Für die Auswertung der Versuche wurden ausschließlich Messwerte verwendet, bei welchem die Massenbilanz einen Fehler von maximal $\pm 10\%$ aufwies. Hiermit wurde sichergestellt, dass die Konzentrationen jeder Probe für sich genommen physikalisch sinnvoll waren.

Die Fehler der Analytik mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wiesen kleine Werte auf, wie aus den Kalibrierungen hervorging. Die Steigung der Kalibrationsgeraden wies eine Unsicherheit von maximal $2,5\%$ auf und die Regressionskoeffizienten waren größer als 0,998.

Bei kinetischen Messungen wurden Messpunkte (Konzentrationen und Reaktionsgeschwindigkeiten) doppelt vermessen und unabhängig von Abweichungen untereinander verwendet (sofern der Fehler der Massenbilanz kleiner als $\pm 10\%$ war). Durch die direkte Verwendung sämtlicher Messwerte (ohne vorherige Mittelung) wurde sichergestellt, dass die Variationen bei der Regressionsrechnung berücksichtigt wurde.

5.2.2 Verwendung protonierter Neuraminsäure

Bei der Vermessung der Reaktionskinetik der Rückreaktor der Aldolase wurde protonierte *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) verwendet. Wurde eine Reaktion ausgehend von *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) oder *N*-Acetyl-D-mannosamin (ManNAc) durchgeführt, wurde deprotoniertes Pyr verwendet, welches zu einer deprotonierten Neu5Ac führt. Dies zeigte sich unter anderem darin, dass der pH-Wert nicht verändert wurde, wenn Neu5Ac aus ManNAc und Pyr gebildet wurde. Wenn aber eine Lösung bestehend aus der gekauften Neu5Ac angesetzt wurde, wies diese einen niedrigen pH-Wert auf. Dieser sank bei einer 200 mM Neu5Ac-Lösung (in 100 mM KP_i -Puffer) auf ca. 2. Um die Lösung zu neutralisieren, wurde sowohl die Pufferkonzentration erhöht, als auch NaOH zugegeben. Es ist möglich, dass die Reaktionskinetik der Aldolase durch die geänderten Reaktionsbedingungen verändert wurde. Dies könnte sowohl die Michaelis-Menten-Konstante (K_M^N) als auch die Aktivität der Rückreaktion beeinflussen. Mittels der Haldane-Beziehung

wurde die Gleichgewichtskonstante aus den kinetischen Parametern berechnet und mit der direkt vermessenen Gleichgewichtskonstante vermessen. Beide Methoden führten zu vergleichbaren Ergebnissen, was die Validität der kinetischen Parameter erhöht. Dennoch ist es möglich, dass beide Parameter der Rückreaktion um den gleichen Faktor verfälscht wurden.

Zudem ist zu beachten, dass das verwendete Pyr mit Na^+ versetzt war um ionische Ladungen auszugleichen.

Aus diesem Grund erscheinen Versuche mit deprotoniertem Neu5Ac sowie protoniertem Pyr ohne Na^+ , welche systematisch den Einfluss untersuchen, sinnvoll.

5.3 Wirtschaftlichkeitsanalyse: Vorteile und Kosten von Hochdruck

Wie in dieser Arbeit festgestellt bietet Hochdruck einen positiven Einfluss auf das Reaktionsgleichgewicht und auch auf die Reaktionskinetik. Um diesen Vorteil zu den Kosten der Druckerzeugung zu relativieren, wurde eine Wirtschaftlichkeitsanalyse durchgeführt.

Andere Autoren haben bereits beschrieben, dass Druck eine sehr kostengünstige Möglichkeit ist, Reaktionen zu beeinflussen [4]. Diese Aussage wurde im Rahmen der Wirtschaftlichkeitsanalyse untersucht.

Die Analyse in dieser Arbeit wurde allgemein gehalten um auch auf andere Reaktionssysteme anwendbar zu sein. Diese Wirtschaftlichkeitsanalyse setzt voraus, dass die Abhängigkeit von verschiedenen Parameter vom Druck zuvor vermessen wurden (zum Beispiel die Änderung des molaren Volumens zwischen den Reaktanten und Veränderungen der Affinitäten zum Enzym).

Es konnte gezeigt werden, dass die Selektivität gesteigert werden konnte, wodurch die Aufreinigung des Produktes vereinfacht wird. Dieser Aspekt wird in der folgenden Betrachtung nicht berücksichtigt, da die Aufreinigung speziell für das Modellsystem ist und nicht für beliebige Reaktionen abzuschätzen ist.

Die Verwendung von Hochdruck bildet eine Ergänzung oder Alternative zu bisherigen Strategien wie die Erhöhung des Substratverhältnisses. Auf dies wird in Abschnitt 5.3.1 weiter eingegangen.

Inwiefern die Anwendung von Druck wirtschaftlich sinnvoll ist, hängt davon ab, wie stark die Reaktionsgeschwindigkeit und die Endkonzentration durch Druck beeinflussbar sind. Zunächst wurde die Lage des Gleichgewichts betrachtet, da diese das maximale Potential von Reaktionen darstellt [8]. In beiden Überlegungen wurde ein Festbettreaktor modelliert.

Aus der Wirtschaftlichkeitsanalyse ergab sich zudem ein Prozessfenster, mit welchem der optimalen Betriebspunkt bestimmt werden kann. Da die verwendeten Parameter zu keiner signifikanten Reduktion der Aktivität der Enzyme führten, können alle Parameter im gesamten Fenster verwendet werden (Druck bis 130 MPa, Konzentrationen bis 500 mM).

Für die wirtschaftlichen Betrachtungen wurden keine Investitionskosten (zum Beispiel in geeigneten Verschraubungen, Dichtungen oder Reaktoren) abgeschätzt, da diese vom Maßstab abhängen.

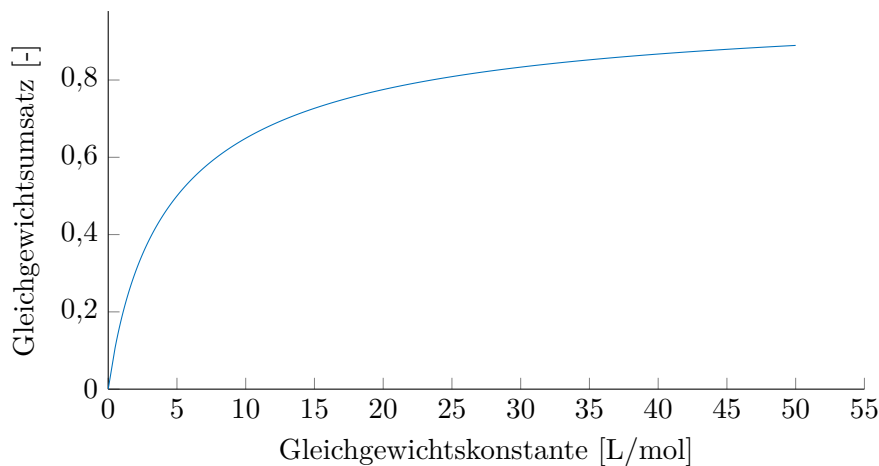


Abbildung 5.1: Gleichgewichtsumsatz in Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten einer 2-zu-1-Reaktion. Beispielhaft für ein Substratverhältnis von 1.

5.3.1 Endkonzentration / Gleichgewicht

Die austretende Konzentration ist durch die Lage des Gleichgewichts begrenzt. Somit stellen Gleichgewichtskonzentration und Gleichgewichtsumsatz eine obere Limitation eines Reaktors dar. Diese hängen von der Gleichgewichtskonstanten K ab (Abbildung 5.1), welche über die freie Gibbs-Energie mit dem Druck verbunden ist (Gleichung (3.66)). Alle folgenden Überlegungen stellen deshalb eine obere Grenze dar. Diese obere Grenze muss wirtschaftlich durch Druck beeinflusst werden, damit die Reaktoren mit realen Umsätzen potentiell wirtschaftlich sind. Ist durch die folgende wirtschaftliche Betrachtung kein Mehrwert durch Druck zu erreichen, muss untersucht werden, ob Hochdruck die Reaktionskinetik optimiert.

In Abbildung 5.1 wurde unter Berücksichtigung von Gleichung (3.66) der Umsatz als Funktion von dem Druck berechnet. Die erhaltene Funktion hängt unter anderem von der Lage des Gleichgewichts bei Referenzbedingungen, aber auch von der Volumenänderung ab, und wurde erfolgreich in Abschnitt 4.4.1 verwendet.

In Abbildung 5.2a ist zu erkennen, dass eine Erhöhung des Drucks keinen Vorteil bringt, wenn das molare Volumen nicht durch die Reaktion reduziert wird ($\Delta V = 0 \text{ mL/mol}$). Ansonsten wird deutlich, dass bei einer Erhöhung des molaren Volumens der Gleichgewichtsumsatz reduziert wird. Außerdem zeigt die Abbildung, dass hohe Gleichgewichtsumsätze schneller erreicht werden, wenn die Volumenänderung groß ist. Reaktionen, bei welchen die Lage des Gleichgewichts bei Umgebungsdruck auf Substratseite liegen, bieten ein höheres Optimierungspotential, welches durch Druck erreicht werden kann (Abbildung 5.2b).

Somit können Reaktionen besonders gut durch Druck beeinflusst werden, wenn folgende thermodynamische Eigenschaften gegeben sind: Die Gleichgewichtskonstante ist bei Niedrigdruck klein und das molare Volumen des Produktes ist kleiner als das der Substrate.

5 Diskussion und Ausblick

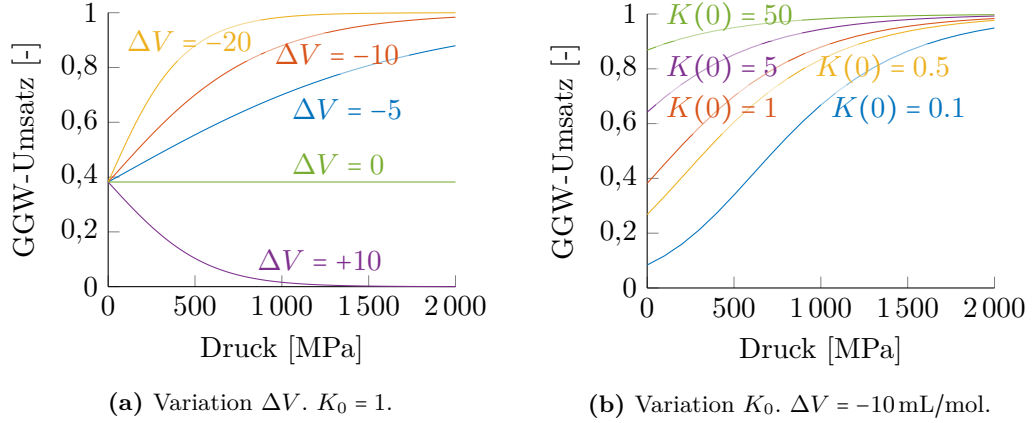


Abbildung 5.2: Grafische Darstellungen von Gleichung (3.67). Änderung des Gleichgewichtsumsatzes für verschiedene Parameter ΔV und K_0 bei äquimolarem Substratverhältnis und $T = 20^\circ\text{C}$. ΔV in mL/mol.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Reaktionen weisen für sich genommen, unvorteilhafte Bedingungen auf. Bei der ersten Reaktion konnte kein signifikanter Einfluss von Druck auf die Gleichgewichtskonstante festgestellt werden ($\Delta V \approx 0$ mL/mol). Zudem war der Gleichgewichtsumsatz (20 %) und die Gleichgewichtskonstante (0,23) niedrig. Die zweite Reaktion besitzt eine Gleichgewichtskonstante, welche im Vergleich zur ersten Reaktion sehr hoch ist (20,9 L/mol). Diese konnte durch Druck weiter erhöht werden ($\Delta V = -16$ mL/mol). Durch die Kombination beider Reaktionen werden die Volumenänderungen addiert und es wird die Gleichgewichtskonstante der Reaktionssequenz durch die Multiplikation der einzelnen berechnet (Gleichung (5.1)).

$$K_{ges} = K_{Epi} \cdot K_{Aldol} \quad (5.1a)$$

$$K_{ges}(0) e^{-\frac{p}{RT}(V_N - V_G - V_P)} = K_{Epi}(0) \cdot K_{Aldol}(0) \cdot e^{-\frac{p}{RT}(\Delta V_{Epi} + \Delta V_{Aldo})} \quad (5.1b)$$

$$= K_{Epi}(0) \cdot K_{Aldol}(0) \cdot e^{-\frac{p}{RT}(V_M - V_G + V_N - V_M - V_P)} \quad (5.1c)$$

$$= K_{Epi}(0) \cdot K_{Aldol}(0) \cdot e^{-\frac{p}{RT}(+V_N - V_G - V_P)} \quad (5.1d)$$

Mit V_G , V_M , V_P und V_N als molares Volumen von GlcNAc, ManNAc, Pyr und Neu5Ac (in m^3/mol).

Die berechneten Verläufe von Abbildung 5.2b geben das gleiche Verhalten wieder, welches auch von Bruins und Mitarbeitern festgestellt wurde [77]. Sie stellten fest, dass aus thermodynamischer Sicht der Prozess bei sehr hohen Drücken (über 1 GPa) optimiert werden könne und der limitierende Faktor die Enzymstabilität bei diesen Drücken sei.

Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass dieses Optimum nur thermodynamisch betrachtet wurde und dass die Steigerung des positiven Effekts durch Druck limitiert ist (maximaler Umsatz ist 100 %). Zeitgleich steigen jedoch die Betriebskosten des Prozesses mindestens linear durch den Energieverbrauch zur Druckgenerierung (hin-

5.3 Wirtschaftlichkeitsanalyse: Vorteile und Kosten von Hochdruck

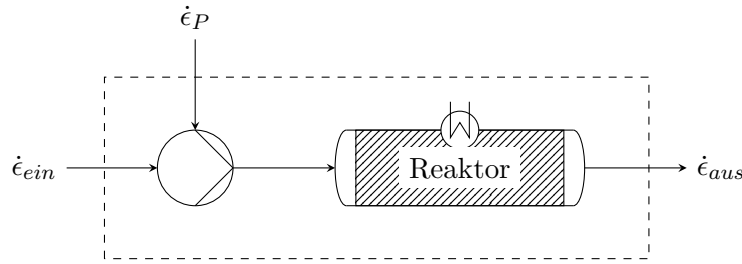


Abbildung 5.3: Geld-Bilanz unter Berücksichtigung der Kosten für das eingesetzte Substrat ($\dot{\epsilon}_{in}$), sowie die Energie zur Generierung des Drucks ($\dot{\epsilon}_P$) und austretendem Wert ($\dot{\epsilon}_{aus}$).

zukommen Steigerungen in der Auslegung und Anschaffung, welche für die folgenden Überlegungen vernachlässigt wurden).

Um den Prozess und den Druckaufbau wirtschaftlich zu betrachten, wurden die Kosten für (beliebig hohen) Druck berücksichtigt. Hierfür wurde der monetäre Wert der verschiedenen Ströme um den Reaktor bilanziert (Abbildung 5.3). Diese Bilanz beinhaltet die Kosten des Substrats, welches in den Reaktor eintritt (Gleichung (5.2)), sowie der Wert der Chemikalien, welche den Reaktor verlassen (Gleichung (5.3)) und die Energiekosten zur Druckgenerierung (Gleichung (5.4)). Vernachlässigt wurden die Kosten für Temperierung, da diese in beiden Fällen identisch anfallen. Da diese Bilanz den kontinuierlichen Prozess betrachtet, werden weiter die Anschaffungskosten nicht berücksichtigt.

Die Geldströme in Abbildung 5.3 wurden zunächst einzeln dargestellt und anschließend in eine Gleichung zusammengeführt.

Die eingehenden Kosten durch die Substrate sind die Preise des Substrats:

$$\dot{\epsilon}_{ein} = \dot{m}_S \cdot k_S = M_S \cdot c_{S,0} \cdot \dot{V} \cdot k_S \quad (5.2)$$

Hierbei ist $\dot{\epsilon}_{ein}$ der in das System eingebrachte monetäre Strom durch Substrate (in €/s), \dot{m}_S der Massenstrom der Substrate (in kg/s), k_S die massen-spezifischen Kosten des Substrates (in €/kg) und M_S die molare Masse der Substrate (in kg/mol).

Das System verlassend ist der Geldwert des Produkts und des nicht umgesetzten Substrats:

$$\dot{\epsilon}_{aus} = \dot{m}_P \cdot e_P + \dot{m}_S \cdot k_S = M_P \cdot c_P \cdot \dot{V} \cdot e_P + M_S \cdot c_S \cdot \dot{V} \cdot k_S \quad (5.3a)$$

$$= (M_P \cdot c_{S,0} \cdot X \cdot e_P + M_S \cdot c_{S,0} (1 - X) \cdot k_S) \dot{V} \quad (5.3b)$$

Hierbei ist $\dot{\epsilon}_{aus}$ der das System verlassene monetäre Wert aus Produkt und nicht umgesetztem Substrat (in €/s), \dot{m}_P der Massenstrom des Produktes (in kg/s), e_P der massen-spezifische Erlös des Produktes (in €/kg) und M_P die molare Masse des Produktes (in kg/mol).

Für die Kosten der Druckerzeugung wurde angenommen, dass diese proportional zu der aufgebrauchten Leistung sind. Um die benötigte Leistung für die Druckänderung zu berechnen, wurde die Stromfadentheorie verwendet (Gleichung (3.59)).

$$\dot{\epsilon}_P = P_P \cdot k_E = \Delta p \cdot \dot{V} \cdot k_E \quad (5.4)$$

5 Diskussion und Ausblick

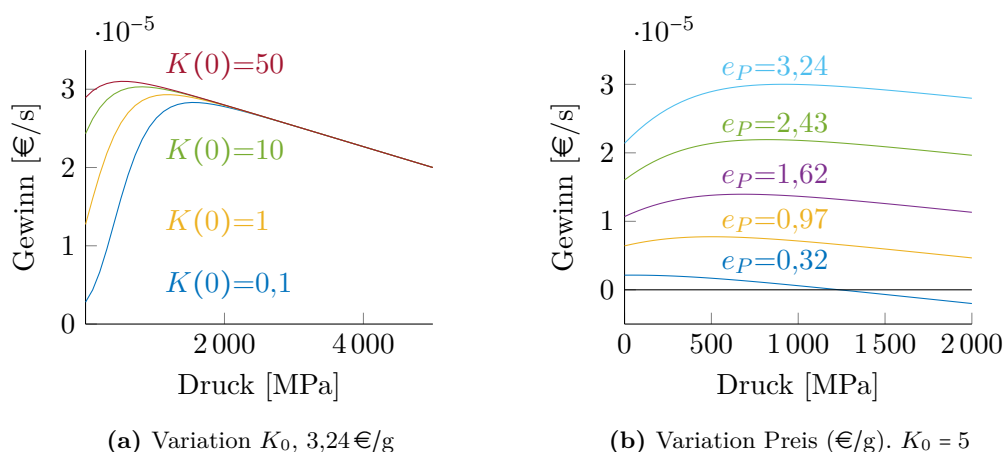


Abbildung 5.4: Graphische Darstellung von Gleichung (5.6) bei verschiedenen Werten für die Lage des Gleichgewichts und den Preis des Produktes. Als ΔV wurde -16 mL/mol verwendet. 40°C . Volumenstrom 2 mL/min . Startkonzentration 1 mol/L für beide Substrate. In A beispielhaft ein Preis von 1000 €/mol , was bei einer Molmasse von 309 g/mol einem Preis von $3,24 \text{ €/g}$ entspricht. In B ein K_0 von 5. Energiekosten wurden als $80 \cdot 10^{-9} \text{ €/J}$ angenommen.

Mit \dot{e}_P als monetärer Strom für Druckerzeugung aufgrund der Energiekosten (in €/s) und k_E als Kosten für Energie (in €/J beziehungsweise €/W/s).

Somit folgt der Gewinn als Erlös (\dot{e}_{aus}) abzüglich Kosten (\dot{e}_{ein} und \dot{e}_P), welcher größer 0 sein sollte.

$$\Delta \dot{e} = +\dot{e}_{aus} - \dot{e}_{ein} - \dot{e}_P \stackrel{?}{\geq} 0 \quad (5.5)$$

$$\Delta \dot{e} = (c_{S,0} \cdot X(p) \cdot (M_P \cdot e_P - M_S \cdot k_S) - \Delta p \cdot k_E) \dot{V} \quad (5.6)$$

Der Zusammenhang zwischen Umsatz und Druck wird durch Gleichung (3.67) abgebildet.

Wenn der Erlös durch das austretende Substrat als erste Wirtschaftlichkeitsabschätzung vernachlässigt wird, wird $e_P \gg k_S$ angenommen. CARBOSYNTH verlangt bei einer Reinheit von $>0,98\%$ 5 €/g für Neu5Ac [184], $0,1 \text{ €/g}$ für GlcNAc [185] und $0,12 \text{ €/g}$ für Pyr [186].

In Abbildung 5.4 wurden verschiedene Szenarien simuliert. Zu einem wurde die Position des Gleichgewichts (K_0) variiert (Abbildung 5.4a). Zu sehen ist, dass der Gewinn, welcher mittels Druck erhöht wird, bei Reaktionen stärker erhöht wird, wenn die Reaktion ein niedriges K_0 beziehungsweise einen niedrigen Gleichgewichtsumsatz bei Niedrigdruck aufweist. Reaktionen, bei welchen der Gleichgewichtsumsatz bei Niedrigdruck hoch ist, haben weniger Potential, dass dieser weiter gesteigert werden kann. Aus diesem Grund bringt die Verwendung von Druck in diesem Fall einen weniger starken Vorteil. An einem Punkt (ca. 2 GPa) ist der Gleichgewichtsumsatz nahe 100% und so wird durch eine Erhöhung des Drucks kein Vorteil generiert (vergleiche Abbildung 5.2b).

5.3 Wirtschaftlichkeitsanalyse: Vorteile und Kosten von Hochdruck

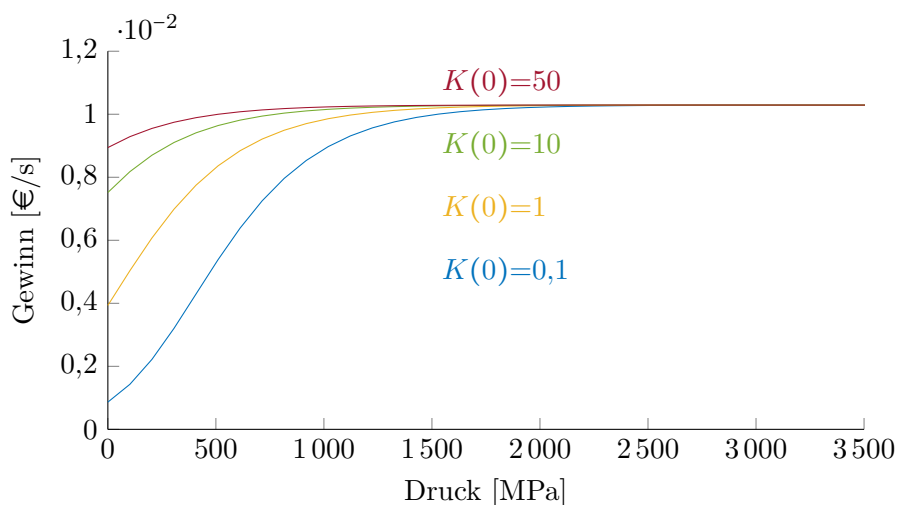


Abbildung 5.5: Gleiche Simulation wie Abbildung 5.4 mit einem Produktpreis von 1 000 €/g.

Zum anderen wird in Abbildung 5.4b deutlich, dass die Kosten für die Generierung des Drucks bei niedrigpreisigen Produkten (0,32 €/g) überwiegen und die Verwendung von Hochdruck bei diesen Reaktionen nicht wirtschaftlich ist. Für diese Abschätzung wurden ein Preis von $80 \cdot 10^{-9}$ €/J angenommen was 0,288 €/kWh entspricht. Andere Werte für die Energiekosten ändern die Steigung der Graphen ohne die allgemeine Form zu verändern. Wie Abbildung 5.4a zeigt, ändert sich auch der Gewinn mit verschiedenen Werten für die Lage des Gleichgewichts. Da in der vorliegenden Arbeit die Größenordnung von K_0 5 L/mol betrug, wurde dieser Wert gewählt.

Ein niedriger Wert für K ist äquivalent mit einem geringen Gleichgewichtsumsatz, was dazu führen kann, dass der Preis des Produkts höher ist (da die Reaktion thermodynamisch limitiert ist). Somit begünstigen sich die in den Abbildungen 5.4a und 5.4b festgestellten Effekte gegenseitig.

Dadurch, dass die Gleichgewichtskonstante der gesamten Reaktion das Produkt der Gleichgewichtskonstante der Einzelreaktionen ist, reduziert die niedrige Gleichgewichtskonstante der Epimerase ($K \approx 0,25$) die Konstante der Gesamtreaktion. Da das molare Volumen von GlcNAc und ManNAc ähnlich ist, wird die Änderung des molaren Volumens der Gesamtreaktion nicht verändert und die Sensitivität bleibt erhalten ($\Delta V_{ges} = \Delta V_{Epi} + \Delta V_{Aldo}$).

Für sehr hochpreisige Chemikalien (1 000 €/g) sind die Energiekosten zur Druckgenerierung vernachlässigbar und die Verwendung von Druck führt zu kaum einem wirtschaftlichen Nachteil (Abbildung 5.5).

Gleichung (5.5) stellt eine Methodik dar, mit welcher der wirtschaftliche Aspekt *a priori* untersucht werden kann. Sollte diese „negativ“ ausfallen, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass durch die Erhöhung des Umsatzes die Aufreinigung vereinfacht und somit kostengünstiger wird.

Aufgrund der erhöhten Anschaffungskosten für spezielle, druckresistente Bauteile, kann

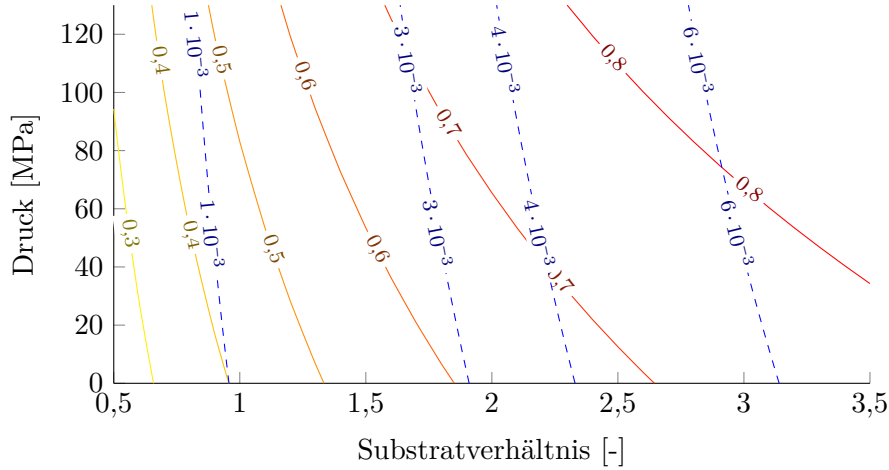
5 Diskussion und Ausblick

das Argument angebracht werden, dass die Verschiebung des Gleichgewichts auch mit einer Erhöhung des Substratverhältnisses erreicht wird. Diese Strategie wurde für die vorliegende Reaktion mehrfach publiziert [51, 52]. Zum einen wird die Epimerase durch Pyr inhibiert, weshalb Substratverhältnisse nicht beliebig erhöht werden sollten. Zum anderen können beide Strategien zeitgleich verwendet werden (Substratverhältnis größer als 1 und Hochdruck). Zuletzt kann angeführt werden, dass das Substratverhältnis nicht beliebig hoch gewählt werden kann, sollte die Konzentration von GlcNAc hoch sein (Löslichkeitsgrenze von Pyr).

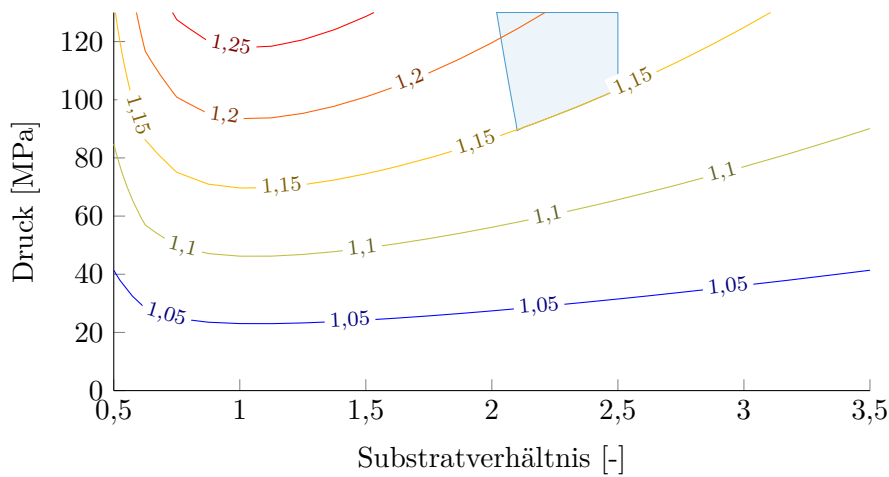
Wie in Abbildung 5.6a deutlich wird, kann mit einer Erhöhung des Drucks das Substratverhältnis reduziert werden, um den gleichen Umsatz zu erreichen. Zudem wurde der Gewinn in Abhängigkeit von dem Druck und dem Substratverhältnis berechnet. Durch diese drei Aspekte lässt sich das Prozessfenster eingrenzen. Aus einem Satz an Bedingungen (z.B. Substratverhältnis bis 2,5 (Aufgrund von Aufreinigungsschritten), Druck bis 130 MPa, Gleichgewichtsumsatz mindestens 0,7, Gewinn mindestens $4 \cdot 10^{-3}$ €/s und Gewinnerhöhung durch Hochdruck von mindestens 15 %) ergibt sich ein Prozessfenster (Abbildung 5.6b).

Abbildung 5.7 bildet ab, um wie viel der Umsatz (absolut) gesteigert werden kann.

5.3 Wirtschaftlichkeitsanalyse: Vorteile und Kosten von Hochdruck



(a) durchgezogene Linien stellen Umsatz, gestrichelte Linien stellen Gewinn dar



(b) Gewinn relativ zu 0,1 MPa

Abbildung 5.6: Verschiedene Höhenlinien in Abhängigkeit vom Substratverhältnis und vom Druck. Simuliert wurde mit den Werten der gekoppelten Reaktion ($K_0 = 0,23 \cdot 20$ und $\Delta V = -16 \text{ mL/mol}$). GlcNAc-Konzentration $0,25 \text{ mol/L}$. In Abbildung A sind die Höhenlinien des Gleichgewichtsumsatzes (farbig, durchgezogen) und absoluten Gewinns (blau, gestrichelt) aufgetragen. In Abbildung B wurde der Gewinn bei gegebenem Druck auf den Gewinn bei $0,1 \text{ MPa}$ bezogen. In Abbildung B ist zudem ein exemplarisches Prozessfenster eingezeichnet, welches Gewinn, Druck, Substratverhältnis und Gewinnsteuerung mittels Druck berücksichtigt.

5 Diskussion und Ausblick

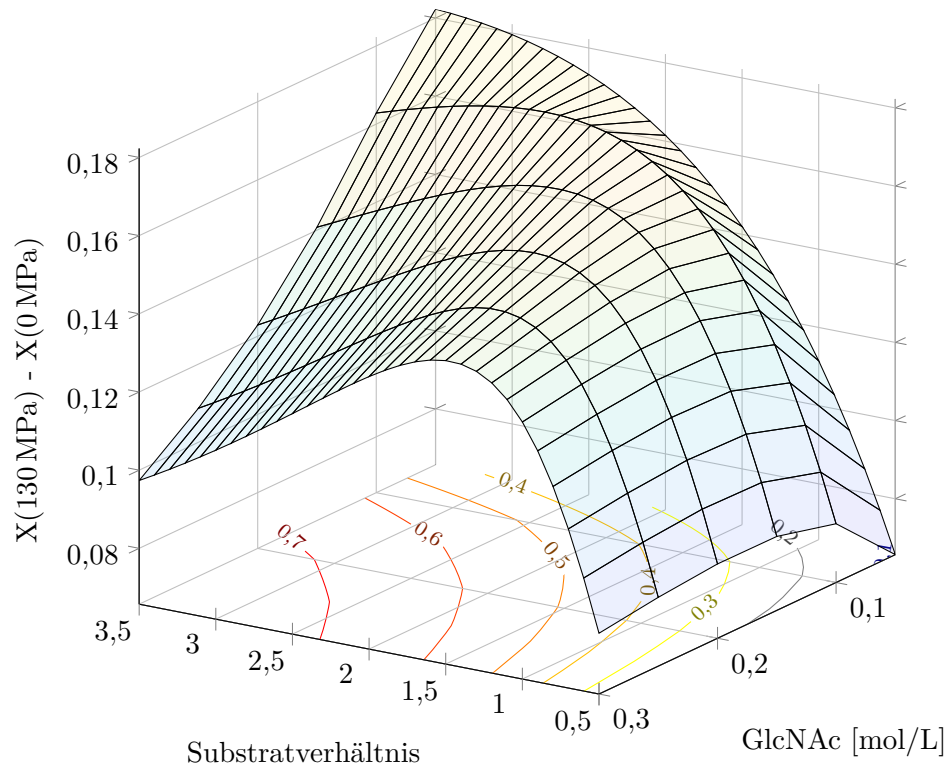


Abbildung 5.7: Differenz der Gleichgewichtsumsätze zwischen Hoch- und Niedrigdruck. Es wurde die Konzentration von GlcNAc und das Verhältnis zwischen Pyr und GlcNAc variiert. Die Farben der Höhenlinien ist nicht mit der Farben/Höhe in Fläche korreliert. Die Höhenlinien sind die berechneten Umsätze bei Umgebungsdruck. Verwendet wurden die Parameter der gekoppelten Reaktion.

5.3.2 Kinetik

Analog zur der Bilanz monetärer Flüsse für den Festbettreaktor (Abbildung 5.3) kann eine monetäre Bilanz für den Umlaufreaktor aufgestellt werden, welche die Kosten mit der Zeit integriert:

$$\Delta\epsilon(t) = \underbrace{-\Delta p \cdot \dot{V} \cdot k_E \cdot t}_{\text{Energiekosten}} - \underbrace{c_{S,0} \cdot V_{Rea} \cdot M_S \cdot k_S}_{\text{Kosten für Substrat}} + \dots \quad (5.7)$$

$$\dots + \underbrace{X(t) \cdot c_{S,0} V_{Rea} M_P \cdot e_P}_{\text{Erlös durch Produkt}} + \underbrace{(1 - X(t)) c_{S,0} \cdot V_{Rea} \cdot M_S \cdot k_S}_{\text{Erlös durch Substrat}}$$

Beispielhaft wurde mit den gegebenen Parametern für die Kinetik Gleichung (5.7) für verschiedene Preise des Produkts ausgewertet. Hierbei wurde auch die Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom Druck berücksichtigt. Abbildung 5.8 ist dabei exemplarisch zu sehen, da der Preis für das Produkt durch die Reaktion gegeben ist. Da die Simulation für einen Satzreaktor durchgeführt wurde, wird kein zusätzlicher Gewinn generiert, sobald sich die Reaktion im Gleichgewicht befindet. Zeitgleich steigen die Kosten, sollte Hochdruck verwendet werden. Aus diesem Grund werden die Konzentrationsverläufe für Umgebungsdruck und Hochdruck betrachtet (Abbildung 5.9).

Wie in Abschnitt 4.4.2 und Abschnitt 4.5.1 gezeigt wurde, wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit entweder durch Druck nicht oder negativ beeinflusst. Hinzu kommt, dass Druck die Affinität von Pyr (Inhibitor) zur Epimerase erhöht während die von ManNAc zur Aldolase reduziert wurde, welches die Reaktionsrate senkte. Diesen Nachteilen steht der Vorteil gegenüber, dass die Affinität von Pyr auch zur Aldolase gesteigert wurde, welches die Reaktionsrate der zweiten Reaktion erhöht.

Simulationen wie in Abbildung 4.33 und Abbildung 5.9 zeigen, dass Hochdruck die Reaktion zu Beginn langsamer ablaufen lässt als unter Umgebungsdruck. Mit Fortschreiten der Reaktion wird die Lage des Gleichgewichts erreicht, weshalb ab einem Zeitpunkt die Produktkonzentration bei Hochdruck höher ist als zum gleichen Zeitpunkt bei Niedrigdruck. Da die Vermessung der Rückreaktion der Aldolase nur eingeschränkt möglich war, ist die Simulation bei hohen Produktkonzentrationen mit Unsicherheit belegt, wie auch in Abbildung 4.33 gezeigt wurde.

Wird die Simulation qualitativ bewertet, kann eine kritische Zeit bestimmt werden, ab welcher die Konzentration von Neu5Ac bei Hochdruck höher als die Konzentration bei Niedrigdruck ist (Abbildung 5.9). Diese kritische Zeit hängt von den eingesetzten Konzentrationen von GlcNAc und Pyr ab und ist in Abbildung 5.10 berechnet.

Da der Druck auch bei laufender Reaktion geändert werden kann, wäre eine Lösung mit diesem Nachteil umzugehen, dass der Reaktor zu Beginn bei Umgebungsdruck betrieben wird und der Druck erst nach einer Zeit erhöht wird. Mit einer solchen Fahrweise wäre die langsamere Reaktionsrate umgangen, während man den Vorteil der Gleichgewichtsverschiebung beibehält.

5 Diskussion und Ausblick

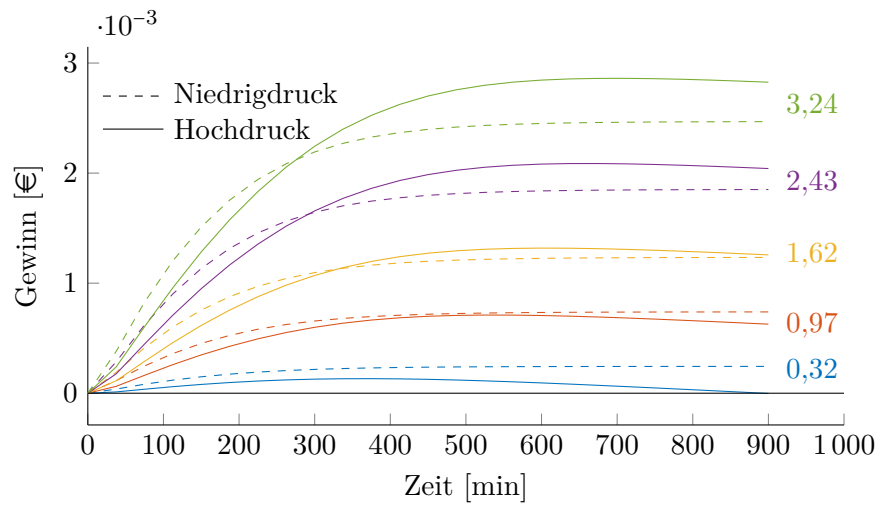


Abbildung 5.8: Wertgewinn mit der Zeit für verschiedene Produktpreise (in €/g) und Drücken (130 MPa und Umgebungsdruck). Verwendet wurde eine Flussrate von 2 mL/min, ein Reaktorvolumen von 10 mL und Startkonzentrationen von 0,5 mol/L. 55 mg Epimerase und 150 mg Aldolase.

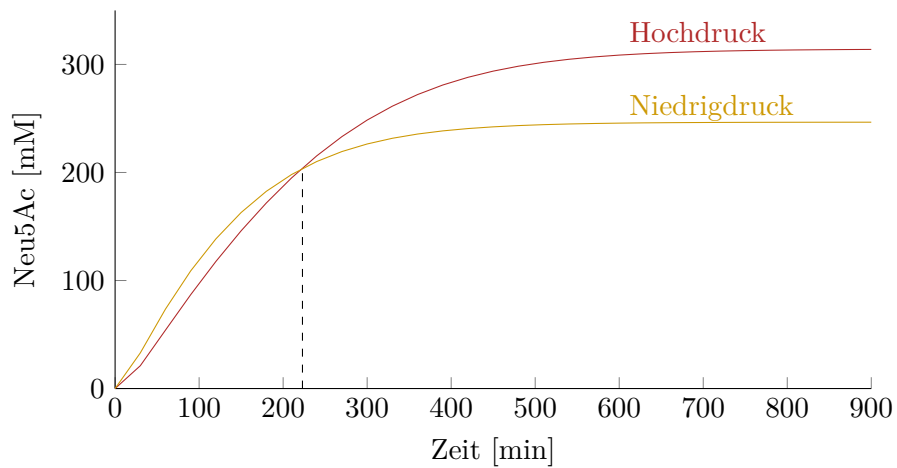


Abbildung 5.9: Simulierter Verlauf der Produktkonzentration bei Niedrig- und Hochdruck. Startkonzentrationen betragen 0,5 mol/L GlcNAc und Pyr. 57 mg Epimerase und 179,8 mg Aldolase, Gesamtvolumen 7 mL.

5.3 Wirtschaftlichkeitsanalyse: Vorteile und Kosten von Hochdruck

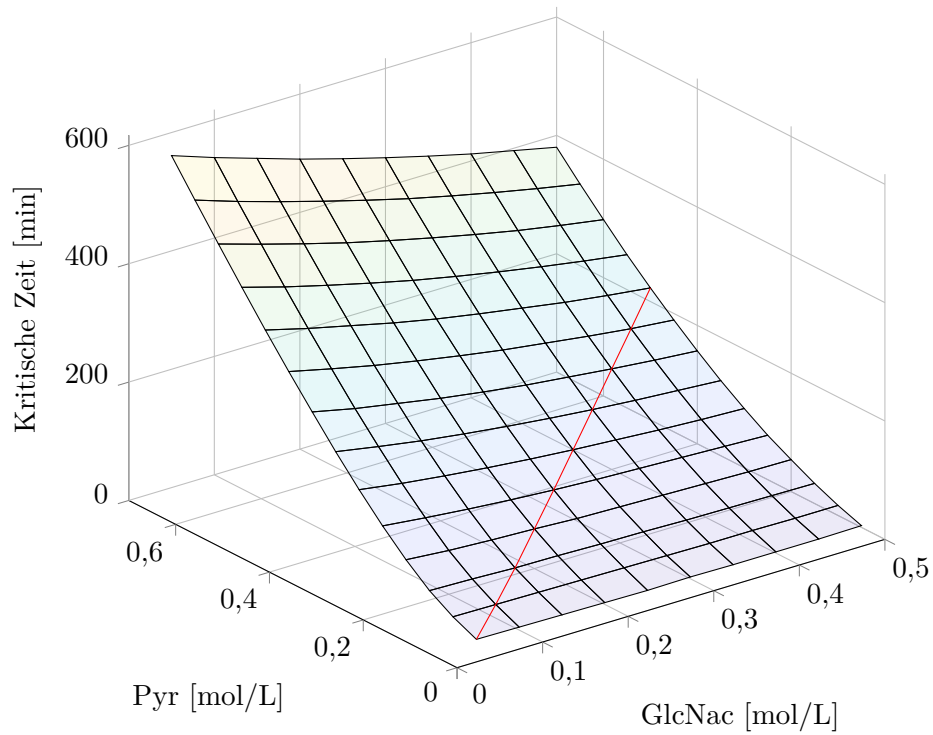


Abbildung 5.10: Berechnete kritische Zeit, ab welcher die Produktkonzentration eines Hochdruck-Versuchs die eines Niederdruckversuchs übersteigt. Rot eingezeichnet sind Simulationen mit einem Substratverhältnis von 1.

5.4 Ausblick

Um vollständig auszuschließen, dass Diffusionseffekte einen Einfluss auf die berechneten, kinetischen Parameter haben, muss die Partikelgrößenverteilung der zerkleinerten Enzym-Träger-Präparate aufgenommen werden. Anschließend müssen diese weiter zerkleinert oder ursprüngliche Präparate weniger stark zerkleinert werden und die Kinetik erneut aufgenommen und wie in Abbildung 4.17 verglichen werden. Zudem muss die Partikelgrößenverteilung bekannt sein, um quantitative Aussagen treffen und die Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können.

Aufgrund des gezeigten Potentials von Hochdruck für die Produktion von Neu5Ac wird auch Potential in einer Folgereaktion von Neu5Ac zu Sialyllaktose gesehen. Diese wird im Rahmen der Forschungsallianz protP.S.I. weiter untersucht.

Sofern Hochdruck bei dieser Reaktion auch einen positiven Effekt aufweist (Beschleunigung der Reaktionsrate und/oder Verschiebung der Lage des Gleichgewichts zum Produkt) können die Synthesebedingungen optimiert werden. Für die Optimierung sollten die Abhängigkeit zwischen den kinetischen Parameter und Druck genauer aufgelöst werden.

Ein vielversprechender Aspekt, welcher nicht nur auf das untersuchte System anzuwenden ist, ist die Steigerung der Affinität zwischen Pyr und den beiden untersuchten Enzymen. Wenn dies auch für andere Enzyme gilt, wäre es möglich diesen Effekt für andere Reaktionen oder zur Kofaktor-Regenerierung, welche auf Pyr aufbauen, zu nutzen.

Zuletzt wiesen die Vermessungen des Schmelzpunktes der Epimerase darauf hin, dass dieser irreversibel durch Hochdruck erhöht werden konnte. Da die Enzyme nur kurz Druck ausgesetzt waren, ist zu untersuchen, ob längere Exposition zu stärkeren Erhöhungen führt und wie sich dies auf die Langzeit- und Temperaturstabilität auswirkt. Die mögliche Erhöhung der Reaktortemperatur aufgrund von höheren Drücken ist ein Aspekt, welcher in der Forschungsallianz protP.S.I. untersucht wurde.

Da der Hochdruckumlaufreaktor im Pufferbehälter Umgebungsdruck aufweist, ist der Einsatz von Echtzeitmessung ohne spezielle Hochdruckausrüstung möglich. Als qualitativer Machbarkeitsnachweis wurde ein Umlaufreaktor mit freier Epimerase verwendet und der Reaktionsfortschritt der Epimerisierung mittels eines Raman-Lasers in Echtzeit und inline-Analytik verfolgt. Die berechnete GlcNAc-Konzentration ist in Abbildung 5.11 dargestellt. Durch die Addition von 500 μ L der Epimerase-Lösung war eine Verdünnung der GlcNAc-Konzentration zu erwarten. Die Zugabe der Epimerase-Lösung reduzierte die berechnete GlcNAc-Konzentration. Weiter wurde die Konzentration erhöht, als 2 mL einer 200 mM GlcNAc-Lösung zugesetzt wurden. Die berechneten Konzentrationen gaben die zu erwartenden Verläufe qualitativ wider. Nach der ersten Zugabe der Epimerase-Lösung war eine Reduktion der GlcNAc-Konzentration von 190 mM auf 180 mM zu erwarten. Die Raman-Messung und das chemometrische Modell berechneten jedoch (161 ± 17) mM.

Ab 40 min nahm die GlcNAc-Konzentration ab, was den Reaktionsverlauf widerspiegelte. Durch geeignetere Kalibrationen wäre die Echtzeitanalyse eine geeignete Methode zur Aufnahme des Reaktionsfortschritts. Würde diese auf den Rest des Reaktionssystem ausgeweitet werden, könnten Analysezeiten deutlich reduziert werden. Zudem könnte

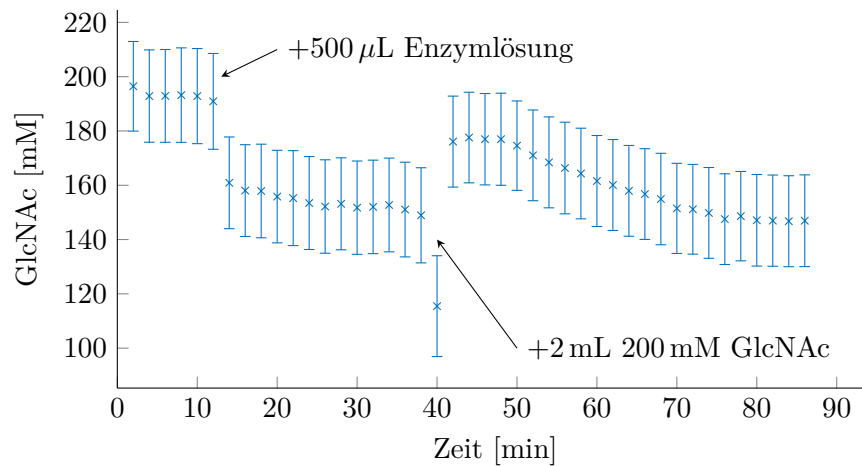


Abbildung 5.11: Freie Epimerase im Umlaufreaktor. Umgebungsdruck, 40 °C, Flussrate 2 mL/min, 8 mL Reaktionsvolumen, 50 mM KP_i-Puffer (pH 7,50). Konzentration der Enzymlösung 3,2 g_E/L. Startkonzentrationen 0,2 g_E/L Epimerase 200 mM GlcNAc. Sämtliche Lösungen enthielten 1 mM Adenosin triphosphat (ATP) und 1 mM MgCl₂.

das Reaktionsmedium mit einer deutlich höheren Messfrequenz und ohne Entnahme von Reaktionsmedium vermessen werden.

Während der entwickelte Reaktor für den Labormaßstab geeignet ist, wird für den industriellen Maßstab eine andere Art des Druckaufbaus benötigt. Da durch Pumpen stärkere Druckschwankungen verursacht werden können, ist es essentiell zu untersuchen, ob die Enzyme durch regelmäßige Druckschwankungen beeinflusst werden. In den Versuchen dieser Arbeit kam es unregelmäßig zu solchen Druckstößen, welche die Aktivität der Enzyme nicht signifikant verändert haben.

Zuletzt sollte die Homogenität des Drucks im Reaktor selbst untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Druck global und als homogen betrachtet. Um die umströmten Partikel ist der Druck nicht identisch [187]. Um zu bewerten, ob diese Druckunterschiede die auf der Oberfläche gebundenen Enzyme signifikant beeinflussen, sind entsprechende strömungsmechanische Berechnungen durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Um zu der Entwicklung der Biotechnologie beizutragen wurden zwei Aspekte identifiziert, welche in dieser Arbeit adressiert wurden. Zum einen wird von verschiedenen Autoren großes Potential in kontinuierlich arbeitenden Reaktorkonzepten gesehen. Zum anderen bieten Hochdruck als neuer Prozessparameter Möglichkeiten zur Prozessintensivierung.

Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit zunächst ein Reaktorkonzept im Labormaßstab entwickelt, welches zum einen kontinuierlich arbeitet und zum anderen mittels Hochdruck (bis 130 MPa / 1300 bar) die Ausbeute einer Modellreaktion erhöht.

Als Modellsystem wurde die Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) ausgehend von *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) und Pyruvat (Pyr) gewählt, da Neu5Ac wirtschaftlich interessant ist und die Reaktionssequenz eine 2-zu-1-Reaktion darstellt. Für diese Reaktionen bestand die Arbeitshypothese, dass das molare Volumen des Produkts (Neu5Ac) geringer als das der Substrate (GlcNAc beziehungsweise *N*-Acetyl-D-mannosamin (ManNAc) und Pyr) ist und somit die Lage des Gleichgewichts durch Druck beeinflusst werden kann. Zudem ist der erste Schritt der Reaktionssequenz durch einen niedrigen Gleichgewichtsumsatz limitierend für die gesamte Reaktionssequenz, weshalb Druck als neuer Prozessparameter untersucht wurde. Neben dem thermodynamischen Gleichgewicht wurde auch der Einfluss von Hochdruck auf die Reaktionskinetik vermessen.

Der realisierte Reaktoraufbau basiert auf einem Festbettreaktor, Kapillaren mit 50 μm Innendurchmesser und einem Rückdruckregler (RDR), wodurch der Druck im Reaktor erhöht ist. Dabei wurde mittels der Kapillaren bis zu 110 MPa und durch den RDR bis zu 30 MPa erzeugt. Die Verweilzeitverteilung (VZV), Durchmischung und Druckschwankungen des Aufbaus wurden charakterisiert und dieser verwendet, um den Einfluss von Hochdruck auf die Reaktionskinetik zu vermessen. Im Gegensatz zu gängigen Hochdruck-Satzreaktoren bietet das entworfene Reaktorsystem einige Vorteile: Mit Hilfe der Kapillaren und dem Rückdruckregler kann der Druck und mit einer Mischkammer die Konzentrationen im Reaktor verändert werden, während dieser betrieben wird. Hierdurch kann der experimentelle Aufwand kinetischer Messungen deutlich reduziert werden.

Der entworfene Festbettreaktor bietet eine hohe Flexibilität, sodass der Aufbau für thermodynamische Messungen leicht zu einem Umlaufreaktor verändert werden kann. Mit diesem können beliebige Reaktionszeiten erreicht und so das Reaktionsgleichgewicht vermessen werden. Während der Umlaufreaktor mit einem Satzreaktor verglichen werden kann, bietet er dennoch bedeutende Vorteile: Es können Proben entnommen werden, während der Reaktor in Betrieb ist und hoher Druck vorliegt. Dadurch kann der Reaktionsfortschritt direkt vermessen werden ohne wie bei üblichen Hochdrucksatzreaktoren die Reaktion unterbrechen zu müssen. Auch bei dem Umlaufreaktor kann der Druck direkt verändert und die darauf folgenden Änderungen der Konzentrationen vermessen wer-

6 Zusammenfassung

den. Der Hochdruckumlaufreaktor kann mittels nicht für Hochdruck ausgelegte Pumpen modifiziert werden, wodurch ein kontinuierlicher Betrieb ermöglicht wird.

Mittels kinetischer Studien konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von Pyr zu beiden untersuchten Enzymen mit Druck erhöht wird. Dabei sank die Inhibierungskonstante bei der Epimerase von (109 ± 21) mM auf (43 ± 10) mM und die Michaelis-Menten-Konstante der Aldolase von (91 ± 45) mM auf (37 ± 10) mM. Außerdem stieg die Affinität von Neu5Ac zur Aldolase (Rückreaktion). Die Affinität von ManNAc zur Epimerase aber auch zur Aldolase sank durch Hochdruck.

Es konnte gezeigt werden, dass das thermodynamische Gleichgewicht der Aldol-Reaktion von ManNAc und Pyr zu Neu5Ac durch Druck positiv beeinflusst wird. Dies zeigte sich in einer Steigerung der Gleichgewichtskonstante von $(20,9 \pm 0,9)$ L/mol auf $(43,9 \pm 3,0)$ L/mol. Aus diesen Daten wurde eine Änderung des molaren Volumens von $(-16,0 \pm 1,2)$ mL/mol berechnet. Hiermit wurde die Arbeitshypothese der Reduktion der molaren Volumen bestätigt.

Dieser positive Effekt durch Druck zeigte sich auch in der Reaktionssequenz bei welcher GlcNAc und Pyr als Substrate verwendet wurden. Hier konnte die Reaktionsausbeute um 14 % (von 47,5 % auf 54,1 %) gesteigert werden. Auch wurden sowohl der Umsatz, als auch die Reaktionsselektivität mittels Druck erhöht.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde eine Kosten-Nutzen-Analyse für Hochdruck im Allgemeinen etabliert, wobei verschiedene thermodynamische Daten für Simulationen aber auch der monetäre Gewinn verschiedener Produkte berücksichtigt werden. Mit dieser kann die Wirtschaftlichkeit des Einsatzes von Hochdruck *a priori* bewertet werden.

A Material und Methoden

A.1 Material

Verwendete Materialien und Gerätschaften sind nach Kategorien zusammengefasst: verwendete Chemikalien, das Hochdrucksystem, Verbrauchsmaterial, Software und weitere Messgeräte. Bauteile, welche von Firmen mit Hauptsitz in den USA geliefert werden, werden in Zoll (entspricht ca. 2,54 cm) und Fuß (entspricht ca. 30,48 cm) angegeben und hergestellt. Aus diesem Grund werden bei diesen Bauteilen Fuß und Zoll anstelle der SI-Einheiten verwendet.

Die immobilisierten Enzyme wurden von GALAB Laboratories GmbH (GALAB) bereitgestellt [112]. Die Epimerase wurde auf Epoxy methacrylat (ECR 8209M) F200064 mit einer Beladung von 0,041 g_E/g_{Tr} immobilisiert. Die Aldolase wurde auf Amino methacrylat mit einer Beladung von 0,074 g_E/g_{Tr} immobilisiert. Beide Enzyme wurden kovalent an das Trägermaterial gebunden.

GlcNAc, ManNAc, Pyr und Neu5Ac wurden von BIOSYNTH Carbosynth (Compton, Vereinigtes Königreich) hergestellt und vertrieben. 96 %-ige Schwefelsäure, Magnesiumchlorid, Di-Kaliumhydrogenphosphat sowie Kaliumdihydrogenphosphat wurden von CARL ROTH (Karlsruhe, Deutschland) hergestellt und vertrieben. Adenosin triphosphat (ATP) wurde von Sigma Life Science (Taufkirchen, Deutschland) hergestellt und vertrieben.

Zur Bestimmung des Gewichts wurde die Feinwaage A1205-D1 von Sartorius Analytic (Goettingen, Deutschland) und zur Dosierung von Flüssigkeiten Pipetten von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet. Der pH-Wert von angesetzten Pufferlösungen wurde mit dem pH-Meter 766 Calimatic von Knick (Berlin, Deutschland) bestimmt.

Tabelle A.1: Verwendete Chemikalien

Name	CAS-Nummer	Hersteller	Produktnummer
GlcNAc	7512-17-6		A-1200
ManNAc	7772-94-3	BIOSYNTH	MA05269
Pyr mit Na ⁺	113-24-6	Carbosynth	FS06501
Neu5Ac	131-48-6		A-1600
H ₂ SO ₄	7446-93-9		4623.1
MgCl ₂	7786-30-3	CARL ROTH	KK36.2
K ₂ HPO ₄	7758-11-4		P749.2
KH ₂ PO ₄	7778-77-0		3904.1
ATP	34369-07-8		Sigma Life Science

Tabelle A.2: Hochdruckaufbau. Von VICI verkaufte Produkte wurden durch MACHEREY-NAGEL vertrieben.

Bauteil	Hersteller	Produktnummer
UHPLC-Pumpe	Shimadzu	Nexera X2 LC-30AD
Degaser		DGU-20A3R
HPLC Ofen	SYKAM	S 4010
Wasserbad	Julabo	MA-4
Magnet-Rührer	IKAMAG	RCT
Spritzenpumpe	WORLD PRECISION	AL-1000
	INSTRUMENTS	Aladdin-1000
Rückdruckregler	VICI	JR-PBR3
Kapillarenverbinder		IZR1.5
Kapillaren (25 μm)		TNFS800025
Kapillaren (50 μm)		TNFS800050
UV-Detektor	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH - K-2501	
Hochreines Wasser	Evoqua - Ultrapure Water System Ultra Clear 10 TWF	

Tabelle A.3: Verbrauchsmaterial

Gegenstand	Hersteller	Produktnr.
Pipettenspitzen (gelb)	LABSOLUTE	7 695 845
Pipettenspitzen (blau)		7 695 848
Spritzenvorsatzfilter		7 672 433
Gewindeflaschen	Klaus Trott	451100011
-Einsätze	Chromatographie-Zubehör	501106012
-Deckel		3111Y1015
Nylon Membran 0,2 μm	Merck	GNWP04700
Spritzenfilter Nylon 0,2 μm 13 mm	Agilent Technologies Inc.	5191-5908

Tabelle A.4: Software

Name	Hersteller	Version
Matlab 2017a	MathWorks	9.2.0.538062
Matlab 2018a		9.4.0.813654
Curve Fitting Toolbox		3.5.5
OpenLAB CDS	Agilent Technologies	ChemStation Rev.C.01.07 SR[255]
OpenLAB CDS	Inc.	Control Panel 3.5(3.5.0.654)
Unscramber X	Camo Software	10.5

Tabelle A.5: Sonstige Messgeräte

Bauteil	Hersteller	Produktnummer
10 μL bis 100 μL -Pipette	Eppendorf	
100 μL bis 1 000 μL -Pipette	Eppendorf	
Andromeda	NanoTemper	
CamSizer XT	Retsch Technology GmbH	
HPLC-Pumpe	Shimadzu	LC-8A
Feinwaage	Sartorius Analytic	A1205-D1
pH-Meter	Knick	pH-Meter 766 Calimatic
MultiSpec Raman System	tec5	-

A.2 Methoden

Für Regressionsrechnungen wurden sämtliche ermittelten Werte verwendet, um die Streuung des Versuchs zu berücksichtigen. Nach Reis und Saraiva ist das Maß für die Unsicherheit der Rohdaten wichtig [188]. Johnson empfiehlt eine höhere Anzahl an Daten anstelle von Triplikatmessungen [122]. Aus diesem Grund wurden innerhalb einer Messreihe die Einflussgröße häufiger variiert, anstelle den gleichen Punkt mehrfach zu vermessen. Messpunkte, bei welchen die Massenbilanz mehr als 10% abwich, wurden als fehlerbehaftet deklariert und nicht berücksichtigt.

Nach durchgeführten Experimenten wurde die Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC)-Pumpe sowie Kapillaren mit 10 % bis 90 % 2-Propanol in hochreinem Wasser (maximal $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$) gereinigt um bakterielles Wachstum zu unterbinden. Das deionisierte Wasser wurde von Evoqua - Ultrapure Water System von Evoqua (Pittsburgh, Vereinigte Staaten von Amerika) erzeugt.

Zwischen den Experimenten wurde der Volumenstrom der UHPLC-Pumpe überprüft, indem das geförderte Volumen 5 min aufgefangen wurde. Bei Abweichungen wurde die Mischkammer, die Pumpköpfe und die Rückschlagventile gereinigt oder ausgetauscht.

Einzuwiegende Mengen wurden mittels der molaren Masse, Konzentration und dem Volumen der Lösung berechnet:

$$m_i = c_i \cdot V \cdot M_i \quad (\text{A.1})$$

Mit m_i als Masse von i (in kg), V dem Volumen der anzusetzenden Lösung (in m^3) und M_i als molare Masse von i (in kg/mol).

Bei der molaren Masse von Pyr zu anzumerken, dass reines Pyr eine molare Masse von $88 \text{ g}/\text{mol}$ aufweist. Verwendet wurde negativ geladenes Pyr, welches mit Na^+ versetzt ist. Aufgrund des equimolaren Verhältnisses ergibt sich eine molare Masse von $110,04 \text{ g}/\text{mol}$.

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Messungen einer Messreihe in der Reihenfolge randomisiert. Das bedeutet, dass die Substratkonzentration für kinetische Messungen nicht streng auf- oder absteigend waren. Ebenso wurde der Druck zufällig variiert. Durch diese Randomisierung wurde sichergestellt, dass irreversible Effekte erkannt würden.

Tabelle A.6: Molare Massen der eingesetzten Chemikalien

Name	Molare Masse [g/mol]
GlcNAc	221,21
ManNAc	221,21
Pyr (mit Na^+)	110,04
Neu5Ac	309
ATP	551,14
MgCl_2	95,12

A.2.1 Probennahme

Bei Vermessung der Reaktionskinetik im Festbettreaktor wurden 50 μL Reaktionsmedium mit 450 μL hochreinem Wasser (maximal 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$) vermischt, mittels 0,2 μm -Nylon-Spritzenfilter von Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika) gefiltert und mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Die Verdünnung im ersten Aufbereitungsschritt wurde den Konzentrationen angepasst, sodass die Konzentrationen so hoch wie möglich und sich im kalibrierten Bereich befanden. Bevor Reaktionsmedium aufgefangen wurde, wurden stets mindestens 45 s für die Totzeit des Systems zuzüglich fünf Verweilzeiten gewartet. Somit wurde sichergestellt, dass sich das gesamte System im stationärem Betrieb befand. Für die Berechnung der Verweilzeit wurde des Leerraumvolumen des Reaktors verwendet. Aufgrund der Träger im Reaktor ist die Verweilzeit kürzer und der stationäre Betrieb ist nach weniger Zeit erreicht, als berechnet.

Wenn ein Umlaufreaktor verwendet wurde, betrug das Probenvolumen 20 μL um das Reaktionsvolumen so wenig wie möglich zu verändern. Entnommen wurden die Proben in der Nähe des Magnetrührers und der Kapillare zur UHPLC-Pumpe. Verdünnt wurden die Proben in 180 μL hochreinem Wasser (maximal 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$) und anschließend gefiltert.

A.2.2 Bestimmung der Reaktionsrate im Festbett

Aufgrund kurzer Verweilzeiten wurde angenommen, dass die Konzentrationen im Reaktor linear mit der Länge steigen beziehungsweise fallen. (In einem Rührkessel entspräche diese Methodik der Methodik der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit.) Aus diesem Grund wurde die Reaktionsrate (dc/dt) durch ein Steigungsdreieck approximiert. Aufgrund des geringeren freien Volumens im Reaktor wurde die mittlere Verweilzeit mit dem Faktor 0,66 korrigiert (Abschnitt 4.2.2).

$$v = \frac{dc}{dt} \approx \frac{c_P}{t} = \frac{c_P}{\tau} = \frac{1}{0,66} \cdot \frac{c_P}{V_{Rea}/\dot{V}} \quad (\text{A.2})$$

Die Berechnung der Reaktionsraten wurde in sämtlichen Fällen mittels des jeweiligen Produkts (c_P) durchgeführt.

Um mikrobiellem Wachstum in der HPLC-Pumpe und Kapillaren vorzubeugen wurden Lösungen, welche GlcNAc, ManNAc, Pyr oder Neu5Ac enthielten, mittels SpritzenvorbereitungsfILTER von LABSOLUTE (Renningen, Deutschland) vor der Verwendung gefiltert.

A.2.3 Variation von Konzentration mittels Mischkammer

Die Homogenität des Mediums, welches die Mischkammer verlässt, wurde in Kapitel 4 dargestellt und diskutiert.

Potentielle segregierte und alternierende Inhomogenitäten, welche von der Mischkammer durch Umschalten der Leistungen erzeugt werden, sind makroskopisch nicht in einem homogenem Medium unterscheidbar. Um eine hohe zeitliche Auflösung des durch die Mischkammer hergestellten Mediums zu erreichen, wurde ein UV-Detektor (UVD) von

A Material und Methoden

KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH (Berlin, Deutschland) verwendet. Dieser besitzt eine Messfrequenz von 21/s. Im Vergleich ist das (hörbare) Umschalten der Mischkammer deutlich langsamer und die Messfrequenz somit als ausreichend hoch bewertet.

Im Allgemeinen wurde in Leitung A der Pumpe hochreines Wasser (maximal $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$) und in Leitung B eine 10 mM KP_i -Pufferlösung vorgelegt. Zu Beginn wurde ausschließlich Leitung A (Wasser) gefördert und das Signal auf „0“ gesetzt. Dann wurde das Verhältnis der Förderraten von Leistung A und B variiert und jeweils gewartet, bis die UV-Signal stabil war. Die abgelesenen Werte inklusive Rauschen sind in Abbildung 4.9 festgehalten. Die Mischkammer wurde sowohl bei niedrigem ($0,2 \text{ mL}/\text{min}$) als auch bei höherem ($1 \text{ mL}/\text{min}$) Gesamtvolumenstrom (Volumenstrom von Leistung A und Leitung B) getestet.

A.2.4 Berechnung der kinetischen Parameter

Die kinetischen Parameter wurden durch Regressionformeln entsprechend aus der Reaktionsgeschwindigkeit berechnet. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann entweder aus eine Änderung der Substratkonzentration oder Produktkonzentration bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden die jeweiligen Produktkonzentrationen verwendet. Bei einer 1-Substrat-Kinetik (Epimerase Hin- und Rückreaktion sowie Rückreaktion der Aldolase) wurden die MATLAB[®]-Skripte (Michaelis-Menten-Regression) verwendet. Diese Skripte wurden mittels der „Generate Code“-Funktion von **Curve Fitting Toolbox** erzeugt und angepasst. Bei einer 2-Substrat-Kinetik (Hinreaktion der Aldolase) wurde kein Quellcode generiert und die Werte direkt in **Curve Fitting Toolbox** berechnet.

A.2.5 Befüllen des Reaktors und Messung der Enzymmenge

Das Befüllen des Reaktors mit immobilisierten Enzymen wurde mittels Sedimentation einer Enzym-Träger-Suspension erreicht. Hierfür wurde der Reaktor mit der selben KP_i -Pufferlösung befüllt, welche im Versuch verwendet werden sollte. Mittels einer Spritze (ohne Kanüle) wurden die Suspension aus KP_i -Pufferlösung und Immobilisate aufgezogen und die Spritze an die Öffnung des vertikal stehenden Reaktors angesetzt, sodass die Immobilisate in den Reaktor sedimentierten. Sobald das so entstandene Festbett die Öffnung des Reaktors erreichte, wurde dieses per Klopfen des Reaktors verdichtet und neue Partikel nachgefüllt.

Wurde hierdurch keine Komprimierung mehr erreicht, wurde der Reaktor verschlossen und die KP_i -Pufferlösung in Richtung der Sedimentation gefördert. Der Reaktor wurde anschließend erneut geöffnet um zu überprüfen, ob das Festbett durch den Spülvorgang komprimiert wurde. War das Festbett komprimiert, wurde die Sedimentation erneut durchgeführt.

Das Gewicht der eingesetzten Enzymträger wurde nach den Versuchen ermittelt, indem das aus dem Reaktor entnommene Festbett (feucht) über mehrere Tage hinweg bei 55°C getrocknet wurde.

In den meisten Versuchen bestand das Festbett auf einem Enzym-Träger-Präparat (Epimerase oder Aldolase). Wurden beide Enzym-Träger-Präparate zeitgleich in einem Festbett verwendet (z.B. wie in Abbildung 4.31), wurden definierte Volumina an Sediment verwendet. Die Volumina der Sedimente wurden über die Messskala der Spritze gemessen. Es wurden 0,5 mL des Sediments der Epimerase-Träger-Präparate mit 4,5 mL des Sediments der Aldolase-Träger-Präparate vermischt. Da beide Enzym-Träger-Präparate farblich unterscheidbar waren, konnte die Durchmischung optisch auf Homogenität überprüft werden. Die so entstandene Mischung aus beiden Enzym-Träger-Präparaten wurde anschließend in den Reaktor gefüllt.

A.2.6 Ansetzen der KP_i -Puffer-Lösung

Die KP_i -Pufferlösung wurde hergestellt, indem jeweils zwei 200 mM Lösungen an K_2HPO_4 und KH_2PO_4 angesetzt, indem 34,8 g K_2HPO_4 beziehungsweise 27,2 g KH_2PO_4 in 1 L hochreinem Wasser (maximal $0,055 \mu S/cm$) gelöst wurden. Um einen 100 mM KP_i -Puffer mit pH 7,5 zu erhalten, wurden 16 mL der KH_2PO_4 -Lösung mit 84 mL der K_2HPO_4 -Lösung und 100 mL hochreinem Wasser vermischt. Um einen pH-Wert von 8,0 zu erhalten, wurden 5,3 mL der KH_2PO_4 -Lösung mit 94,7 mL der K_2HPO_4 -Lösung und 100 mL hochreinem Wasser vermischt. Nach dem Ansetzen wurde der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit entsprechender 200 mM-Lösungen korrigiert.

Die verwendeten Salze sind laut Hersteller wasserfrei.

A.2.7 UV-Detektor Knauer und Bestimmung der Verweilzeitverteilung des Aufbaus

Bei der Verwendung des Durchfluss-UV-Detektor K-2501 wurden folgende Parameter festgelegt: $\lambda = 200 \text{ nm}$, $t = 0,5 \text{ s}$.

Als Referenz wurde hochreines Wasser verwendet. Zunächst wurden mittels definierten Konzentrationen von KP_i -Lösungen das Signal korreliert (Abbildung A.1). Ab 50 mM wurde eine Sättigung des Detektors festgestellt, weshalb das Signal nur bis 20 mM proportional zur Konzentration ist. Qualitativ konnte das Messsignal bis 100 mM verwendet werden, da dies auch in diesem Messbereich abhängig von der Konzentration war und keine Sättigung eintrat.

Um die VZV des UHPLC-Systems zu vermessen wurde folgende Methodik verwendet: Es wurden die UHPLC-Pumpe sowie die Kapillaren zum Druckaufbau und der RDR durchströmt. An dem Ausgang des RDR wurde der UVD platziert. Das System wurde mit hochreinem Wasser gespült und dies als Referenz des UVD verwendet.

Das Auslassventil der UHPLC-Pumpe wurde geöffnet und die Ansaugkapillare der UHPLC-Pumpe mit einer 100 mM KP_i -Pufferlösung gefüllt. Das Ventil wurde verschlossen und der Start der Pumpe markierte den Zeitpunkt 0 s. Durch dieses Vorgehen wurde sichergestellt, dass die Verweilzeit in den Ansaugkapillaren keinen Einfluss auf die Messung hatten.

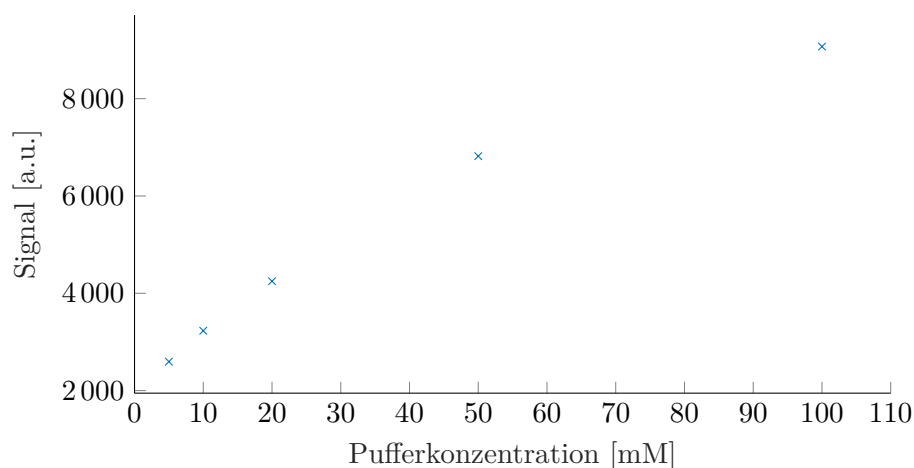


Abbildung A.1: Korrelation zwischen Signal und KP_i -Pufferkonzentration des UVD. Als Referenz wurde hochreines Wasser verwendet. Variiert wurde die KP_i -Pufferkonzentration bei 40°C , Wellenlänge 200 nm.

A.2.8 Bestimmung der Verweilzeitverteilung des Reaktors mittels HPLC

Die VZV des Reaktors wurde mittels einer HPLC bestimmt indem 10 mM KP_i -Pufferlösung injiziert wurde. Hierfür wurde der Reaktor inklusive des aus Enzym-Immobilisaten bestehenden Festbetts anstelle der Trennsäule der HPLC verwendet. Um etwaige Einspülvorgänge im HPLC-System aus den Ergebnissen zu entfernen, wurde eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Hierfür wurden Start- und Endpunkt des Ausschlags durch den Zielstoff markiert und zu null gesetzt. Die so definierte Basislinie wurde als linear zwischen Start- und Endzeitpunkt angenommen.

Um einen zügigen Eintrag der KP_i -Pufferlösung zu gewährleisten wurde die Injektionsrate des Probengebers der HPLC auf den maximal möglichen Wert gesetzt (1 mL/min). Es wurden verschiedene Volumina KP_i -Pufferlösung injiziert ($1\ \mu\text{L}$ und $5\ \mu\text{L}$). Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied in der VZV festgestellt. Für die meisten Versuche wurden $1\ \mu\text{L}$ injiziert, was eine Injektionszeit von 60 ms ergibt.

Die Flussrate des HPLC-Mediums betrug $0,21\ \text{mL}/\text{min}$. Wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, wurde die VZV des HPLC-Systems (ohne Trennsäule oder Reaktor) vermessen und mit der des Systems mit Reaktor verglichen.

A.2.9 Bestimmung der Mischzeit und Reaktionsvolumen des Umlaufreaktors

Zur Vermessung der Mischzeit des Umlaufreaktors wurde der Pufferbehälter mit verschiedenen Volumina von hochreinem Wasser gefüllt und dies mit $2\ \text{mL}/\text{min}$ gefördert. Der UVD wurde hinter der Kapillare platziert, welche in den Pufferbehälter führte (Abbildung 4.12). Als das Signal des UVD konstant war, wurde es als Referenzwert gesetzt. Die Zugabe von $1\ \text{mL}\ 20\ \text{mM}\ \text{KP}_i$ -Pufferlösung in den Pufferbehälter markiert Zeitpunkt „0“.

Um Ablesefehler bei der sich schnell ändernden Anzeige des UVD zu vermeiden, wurde die Anzeige zusammen mit einer Stoppuhr fotografiert.

Nach fünf Minuten war das Signal konstant und somit das Medium homogen durchmischt.

Um das Mischverhalten auch von höherviskosen Medien zu untersuchen wurde der oben beschriebene Versuch wiederholt. Hierbei wurde kein hochreines Wasser, sondern eine 400 mM GlcNAc-Lösung verwendet. Aufgrund des hohen Rauschens des UVD wurde ein gleitender Durchschnitt aus fünf Messwerten (zwei links und zwei rechts vom Messwert) mit dem MATLAB[®]-Befehl `movmean(Signal,5)` berechnet.

Um das Volumen des Umlaufreaktors zu bestimmen wurde, dieser mit hochreinem Wasser gefüllt (Aufbau wie Abbildung 4.12). Die Förderrate der UHPLC-Pumpe betrug 2 mL/min. Nachdem das Signal des UVD konstant war, wurde dies als Referenzwert gesetzt und 1 mL einer 789 mM Pyr-Lösung in den Pufferbehälter gegeben (Konzentration mittels HPLC bestimmt). Da nach ca. 5 min die Lösung homogen war, wurden 10 min gewartet bis das System durchmischt war. Anschließend wurden dem Pufferbehälter drei Probe entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Proben wiesen Pyr-Konzentration von 42,0 mM bis 43,2 mM auf. Das Volumen im Pufferbehälter wurde mittels eines Messzylinder zu 13,3 mL bestimmt. Mittels der Verdünnung der Pyr-Lösung wurde das Gesamtvolumen des Umlaufreaktors zu 18,3 mL bestimmt. Somit besaß der Umlaufreaktor ohne Pufferbehälter ein Volumen von 5 mL, welches durch Entgaser, Mischkammer und Kapillaren unveränderbar war.

A.2.10 Numerische Berechnung kinetischer Parameter

Numerische Berechnungen wurden mittels MATLAB[®] von MathWorks (Natick, Vereinigte Staaten von Amerika) durchgeführt.

Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte numerisch (Anhang A.5). Um auszuschließen, dass das Ergebnis der Regression von den Startwerten abhingen, wurden zufällige Startwerte für die Berechnung generiert. Es wurden 250 zufällige Wertepaare für die Startparameter von K_M und v_{max} mittels der MATLAB[®]-Funktion `rand` erzeugt. Wie Abbildung A.2 verdeutlicht konvergierte das Regressionsverfahren stets zu den gleichen Werten.

Wurden jedoch anstelle der Reaktionsgeschwindigkeit (v in mol/L/min) die spezifische Aktivität (a_{sp} in mol/g/min) verwendet, war das Ergebnis der Regression deutlich von den Startwerten abhängig (Abbildungen A.3a und A.3b). Wurden die Zahlenwerte der spezifischen Aktivität in $\mu\text{mol/g/min}$ berücksichtigt, wodurch sich die Zahlenwerte von K_M und a_{sp} in der selben Größenordnung befanden, konvergierte das Lösungsverfahren (Abbildungen A.3c und A.3d) zu den gleichen Ergebnissen.

Da die Verwendung von der Reaktionsgeschwindigkeit und der spezifischen Aktivität (in $\mu\text{mol/g/min}$) stabile Verfahren bildeten, wurden die Daten entsprechend umgerechnet. Sofern Messergebnisse aus Versuchen stammten, in welchen das selbe Festbett verwendet wurde (also die Enzymmenge bei einer Versuchsreihe konstant war), wurde die Reaktionsgeschwindigkeit verwendet. Wurden die kinetischen Parameter von Messergebnissen verschiedener Festbetten prozessiert wurde die spezifische Aktivität verwendet.

A Material und Methoden

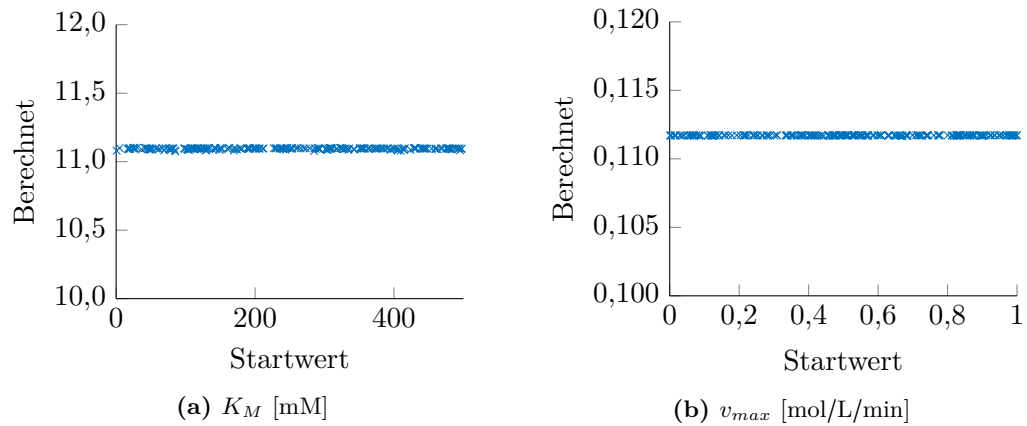


Abbildung A.2: Startwerte für beide Parameter (K_M und v_{max}), welche zeitgleich variiert wurden.

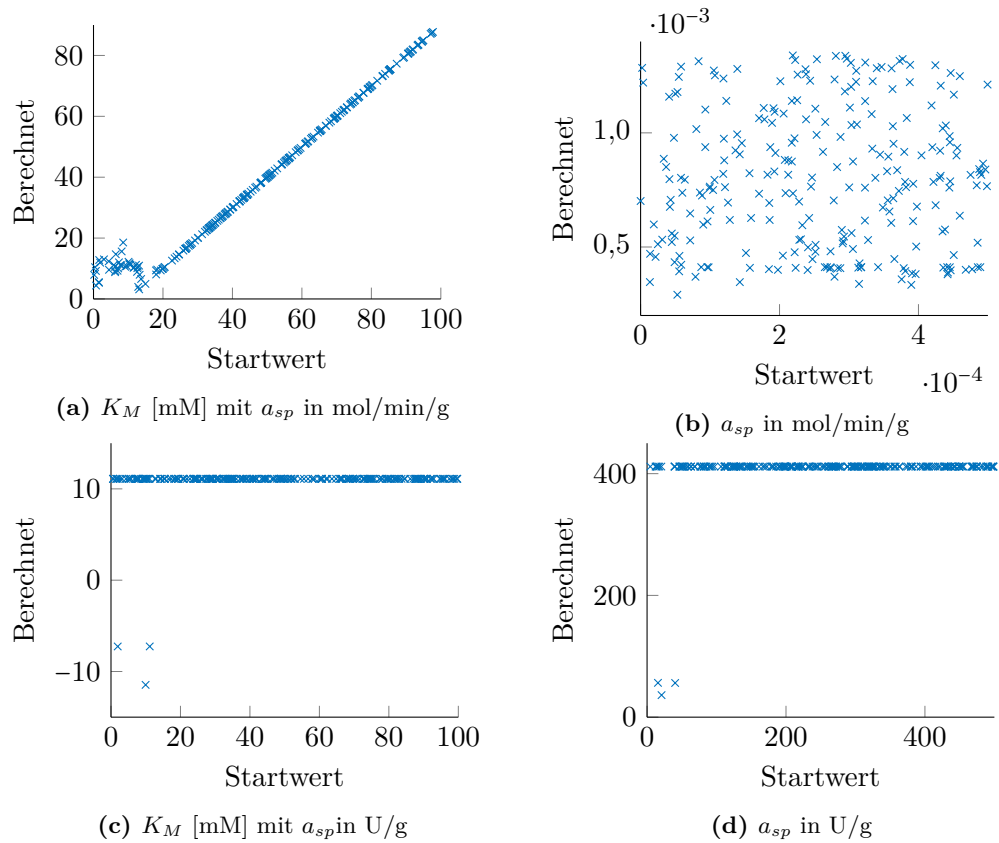


Abbildung A.3: Numerische Berechnung der kinetischen Parameter bei verschiedenen Startwerten und Größenordnungen von der spezifischen Aktivität.

Weiterhin wurden der Startwert für v_{max} (bzw $a_{sp,max}$) als höchster Wert des Datensatzes verwendet und der Startwert für K_M als Mitte des vermessenen Konzentrationsbereiches.

A.2.11 Reaktionsmedium im Umlaufreaktor

Bei Experimenten, bei welchen der Umlaufreaktor (sowohl als Satzreaktor, als auch als kontinuierlich betriebenen Umlaufreaktor) verwendet wurde, wurde der Füllstand im Pufferbehälter zu Beginn markiert und zum Ende das Volumen der Lösung vermessen. Der Füllstand wurde über den Verlauf der Experimente kontrolliert.

Für den kontinuierlich arbeitenden Umlaufreaktor wurden vor dem Versuch 5 mL in den Vorlagebehälter gefüllt und der Füllstand markiert. Dieser Füllstand wurde für die anschließenden Versuche verwendet. Mittels des Volumens von 5 mL (zuzüglich 5 mL Lösung im System) konnte die Verweilzeit über den Volumenstrom der Spritzenpumpen eingestellt werden.

Die Zusammensetzung im stationären Zustand wurde numerisch mittels der MATLAB®-Funktion `fsolve` berechnet (Anhang A.5).

A.2.12 Bewertung der Qualität von Regressionsfunktionen

Um die Qualität von Regressionsfunktionen zu bewerten, wurde der Unterschied zwischen den Messdaten und den Regressionskurven aufgezeichnet. Diese Fehler wurden normiert und auf Muster untersucht [189].

$$F_n = \arctan\left(\frac{y_{mess} - y_{reg}}{2\mu_x}\right) \quad (\text{A.3})$$

Mit F_n als normierte Fehler, y_{mess} als Messdaten, y_{reg} als Regressionsdaten und μ_x als Mittelwerte der Eingangsgröße.

Stimmt die Regressionsformel mit der physikalischen Abhängigkeit der Parameter überein, sollten die Fehler normalverteilt sein und keine Muster aufweisen. Muster in den normierten Fehlern ein Indiz, dass ein physikalischer Effekt nicht beachtet wurde und die Regressionsfunktion angepasst werden sollte.

A.2.13 Numerische Ableitung

Um die Ableitung einer Funktion numerisch zu bestimmen, sind verschiedene Ansätze möglich. In dieser Arbeit wurde die folgende Approximation verwendet [190], welche auch in Literatur zur chemischen Reaktionstechnik beschrieben wurde [191]. Hierbei wird ein konstanter Zeitschritt vorausgesetzt.

$$f'(x_i) = \frac{f(x_{i+1}) - f(x_{i-1}))}{(x_{i+1} - x_{i-1})} \quad (\text{A.4})$$

Mit f als abzuleitende Funktion, x_{i-1} , x_i und x_{i+1} als Stützstellen in x und f' als Ableitung. Speziell für die Berechnung der VZV:

$$E(t_i) = 0,5 \cdot \frac{S_M(t_{i+1}) - S_M(t_{i-1}))}{S_M(t_\infty) \cdot (t_{i+1} - t_i)} \quad (\text{A.5})$$

Diese Formel wurde der Annäherung durch ein Steigungsdreieck vorgezogen, da hier eine höhere Fehlerordnung vorliegt.

Für den ersten und letzten Messpunkt wurde die Ableitung durch ein Steigungsdreieck berechnet.

A.2.14 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels CamSizer

Der CamSizer XT von Retsch Technology GmbH fotografiert die zu untersuchenden Partikel, berechnet aus diesen den Durchmesser und anschließend die Partikelgrößenverteilung. Um Partikel, welche zum Beispiel durch statische Aufladung aneinander haften zu trennen, wurde ein Dispergierdruck von 120 kPa verwendet. Da an dieser Stelle nur Änderungen in der Größenverteilung untersucht wurden war eine qualitative Auswertung der CamSizer-Ergebnisse ausreichend und das Gerät wurde nicht kalibriert. Dies verzerrt eventuell die gemessenen Durchmesser (und damit die Verteilung). Qualitative Aussagen der Größenverteilung (wie die Aussage über die Änderung) können getroffen werden.

Die frischen Partikel wurden direkt mittels des CamSizers vermessen, während eine weitere Probe für mehr als eine Stunde in einem Festbett eingesetzt und bei 80 MPa umströmt. Unter der Annahme, dass die Partikelgrößen normal-verteilt sind, wurde eine Glockenkurve für die Regression verwendet und so die Verteilung charakterisiert.

A.2.15 Kalibration und Auswertung der Raman-Spektren

Die Raman-Sonde MultiSpec Raman System von tec5 (Steinbach, Deutschland) wurde eingesetzt, um zu untersuchen ob eine Unterscheidung von GlcNAc und ManNAc mittels Echtzeit-Analyse möglich ist.

Der hierfür verwendete Aufbau ist in Abbildung A.4 gezeigt.

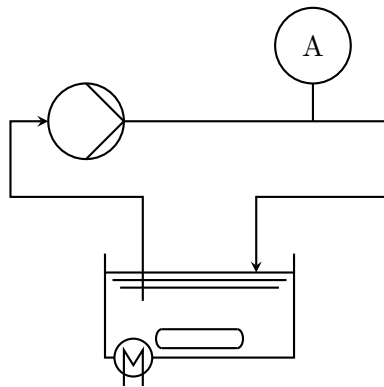


Abbildung A.4: Experimenteller Aufbau zur Machbarkeitsstudie zur Raman-Sonde

Kalibriert wurde das Messsystem mit jeweils 10 Lösungen (0 mM bis 200 mM für GlcNAc und 0 mM bis 100 mM für ManNAc). Von jeder Lösung wurde ein Spektrum vermessen. Bei den Messungen wurde der „dark current“ aufgezeichnet und entfernt. Die Wellenlänge des Lasers betrug 875 nm und der Sensor wurde für 60 s belichtet. Die Wellenbereiche 811 1/cm bis 1 170 1/cm und 2 629 1/cm bis 3 031 1/cm waren sensitiv gegenüber der GlcNAc- beziehungsweise ManNAc-Konzentration. Diese Wellenbereiche

A Material und Methoden

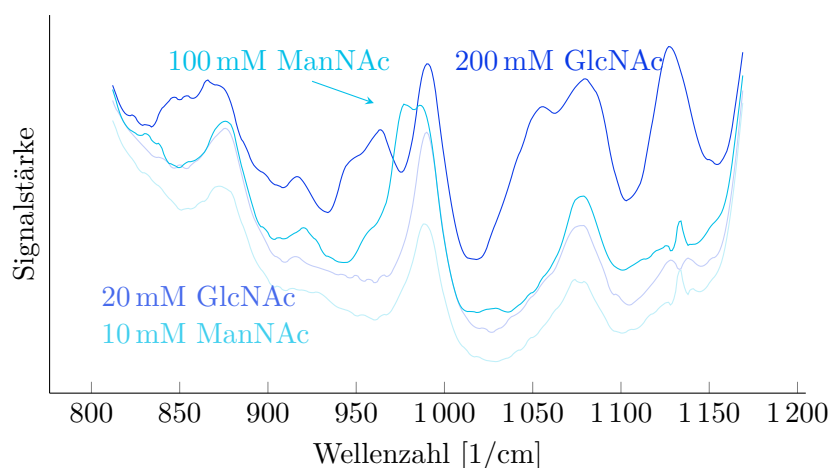


Abbildung A.5: Wellenzahlbereich, welcher sensitiv gegenüber verschiedenen GlcNAc- und ManNAc-Konzentrationen ist. Belichtet wurde der Sensor für 60 s, Wellenlänge des Lasers 875 nm. Um die Lesbarkeit zu erhöhen sind nur die niedrigste und höchste Konzentration gezeigt.

wurden in dem anschließendem chemometrischen Modell, erstellt mittels Unscrambler X (Version 10.5) von Camo Software (mittlerweile aspenTech) (Bedford, Vereinigte Staaten von Amerika), verwendet. Unscrambler X detektierte, dass zwei Hauptkomponenten für das chemometrische Modell ausreichend waren.

Zur Analyse wurde die Raman-Sonde bei einem Satzreaktor eingesetzt, indem die Reaktionslösung mit freien Enzymen über eine Pumpe durch die Messzelle gefördert wurde. Das Spektrum wurde automatisch alle zwei Minuten aufgenommen.

A.2.16 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunktbestimmung wurde mittels Prometheus von NanoTemper (München, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde die Adsorption bei 670 nm bei verschiedenen Temperaturen gemessen und mittels der ersten Ableitung der Schmelzpunkt bestimmt (vergleiche Abbildung A.6). Gelagert wurden die Enzymelösungen (jeweils 10 mg/mL) in 10 mM KP_i -Pufferlösung bei einem pH-Wert von 8,00. Durchgeführt wurde die Vorbehandlung durch Druck bei 0,2 mL/min, 115 MPa und Umgebungstemperatur. Bei den Untersuchungen des Schmelzpunktes der Epimerase wurden jeweils 1 mM ATP und 1 mM $MgCl_2$ zugesetzt.

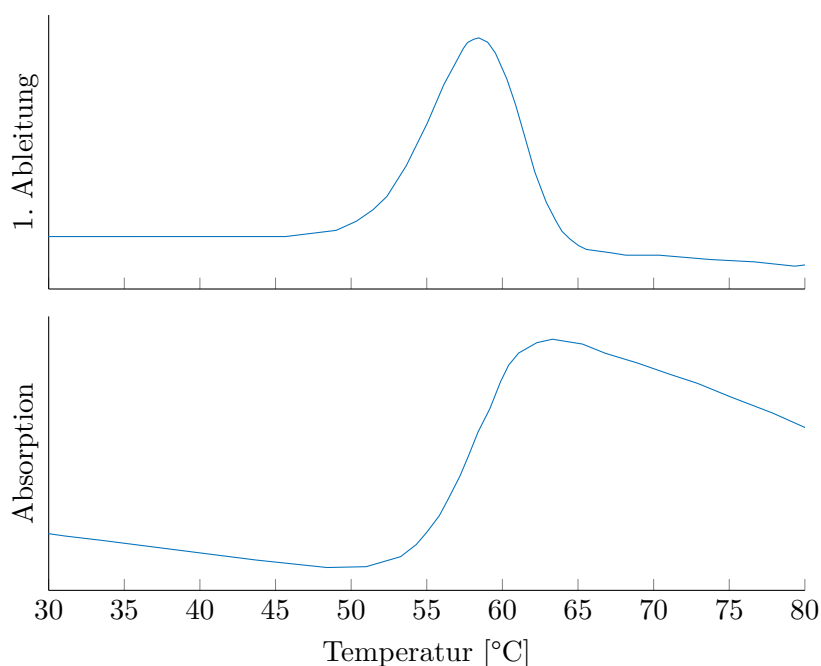


Abbildung A.6: Beispielhaftes Adsorptions-Temperatur-Profil. Epimerasen-Konzentration 10 mg/mL, 1 mM ATP und MgCl₂

A.3 HPLC Kalibration

Die in dieser Arbeit gezeigten Messwerte wurden mittels zwei HPLC-Systeme bestimmt.

Bei allen Systemen wurde die gleiche Methodik verwendet. Die Ofentemperatur betrug 65 °C, die Detektortemperatur 55 °C, Flussrate 0,8 mL/min, sowie zwei Eurocat H-Typ-Säulen von KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, 5 µL Injektionsvolumen, Aufnahme- und Injektionsgeschwindigkeit 0,1 mL/min. Bei Verdünnung wurden die Proben mit hochreinem Wasser (0,055 µS/cm) verdünnt. Jede Probe wurde mit einem 0,2 µm-Nylon-Spritzenfilter von Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika) gefiltert und in eine Gewindeflasche von Klaus Trott Chromatographie-Zubehör (Kriftel, Deutschland) überführt.

Als Laufmittel wurde 5 mM H₂SO₄ in hochreinem Wasser verwendet (533 µL H₂SO₄ in 2 L Wasser). Vor der Verwendung des Laufmittels wurde dieses mit einer Vakuumpumpe und 0,2 µm-Nylon Membran von Merck (Darmstadt, Deutschland) gefiltert.

Das Signal des KP_i-Puffers besaß eine ähnliche Retentionszeit wie Neu5Ac, weshalb sich die Signalausschläge überschneiden. Aus diesem Grund wurden beide Flächen addiert und die Fläche der Null-Probe, in welcher ausschließlich KP_i-Puffer vorhanden war, subtrahiert. Aufgrund von Ungenauigkeiten in der Analytik wurde auf diese Weise die berechnete Konzentration von Neu5Ac verfälscht. Zum Beispiel wurde bei Versuchen, bei welchem die Epimerase untersucht wurde und kein Neu5Ac vorhanden war, Werte

Tabelle A.7: Integrationsparameter für den RID. Alle Einheiten sind willkürlich und werden deshalb nicht angegeben.

	DAD	RI
Steigung	50	100
Mindesthöhe	40	100
Mindestbreite	0.6	0.04
Mindestfläche	100	1
Schultern	aus	aus

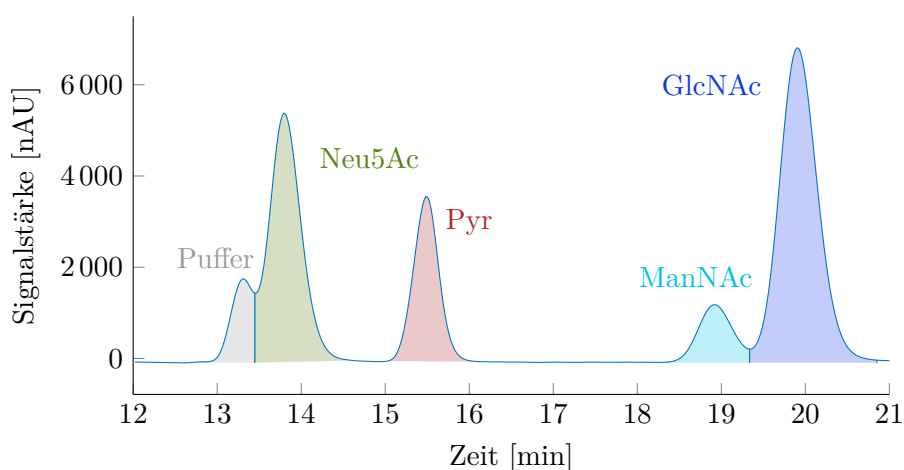


Abbildung A.7: Chromatogramm einer Probe, welche sämtliche Komponenten enthielt.

im Neu5Ac-Signal bis zu 3000 A U detektiert. Wird die Größenordnung der Werte der Kalibrationsgeraden für Neu5Ac berücksichtigt, ist dieser Wert vernachlässigbar.

Tabelle A.7 führt die Parameter zur Peakerkennung auf. Zu Beginn der Arbeit wurde bei der Methodenentwicklung ein Dioden Array Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von 200 nm verwendet. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse wurden ausschließlich durch die Vermessung mittels Berechnungsindexdetektor (RID) erhalten, welcher später verwendet wurde. Der RID zeigte gleichbleibende Analyseergebnisse, während das Signal des DAD mit zunehmender Zeit mehr und mehr Rauschen aufwies.

Zur Auswertung wurden folgende Programme verwendet: Bei dem ersten HPLC-System wurde OpenLAB CDS ChemStation Edition (Rev.C.01.07 SR2[255]) von Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika) benutzt. Bei dem zweiten System wurde Control Panel for OpenLab Software (3.5(3.5.0654)) von Agilent Technologies, Inc. verwendet.

Abbildung A.7 zeigt ein Chromatogramm aus eine Versuch, welches sämtliche Komponenten beinhaltet.

Tabelle A.8: HPLC Systeme von Agilent Technologies, Inc. (In der quarternären Pumpe G7111B ist ein Degaser verbaut.)

Einheit	1. System		2. System	
Degaser	1100 Series	G1379A	1260 Infinity II	G7111B
Pumpe	1100 Series	G1312A	1260 Infinity II	G7111B
Probengeber	1100 Series	G1329A	1260 Infinity II	3G7129A
Säulenofen	1100 Series	G1316A	1260 Infinity II	G7116A
RID	1260 Infinity	G1362A	1260 Infinity II	G7162A

A.3.1 Erstes HPLC System

Die Kalibrationsgeraden wurden bis 10 mM oder 25 mM durchgeführt (dargestellt in Abbildung A.8). In Experimenten erhaltene Proben wurden verdünnt, sodass die erwartete Konzentration in dem kalibrierten Bereich lag.

In Tabelle A.9 sind die Statistiken der Kalibrationsgeraden festgehalten (inklusive Gleichung der Ausgleichsgeraden).

Tabelle A.9: Statistiken zu Abbildung A.8 und typische Retentionszeiten der verschiedenen Komponenten.

Spezies	$s/10^3$	$b/10^3$	$RMSE/10^3$	R^2	t [min]
GlcNAc	$12,83 \pm 0,26$	$2,07 \pm 3,19$	1,59	0,9998	20,0
ManNAc	$11,48 \pm 0,41$	$1,25 \pm 2,48$	1,23	0,9993	18,9
Pyr	$4,58 \pm 0,15$	$0,75 \pm 2,29$	1,14	0,9994	15,5
Neu5Ac	$16,04 \pm 0,38$	$1,45 \pm 2,30$	1,14	0,9997	13,9
KP _i -Puffer					13,4

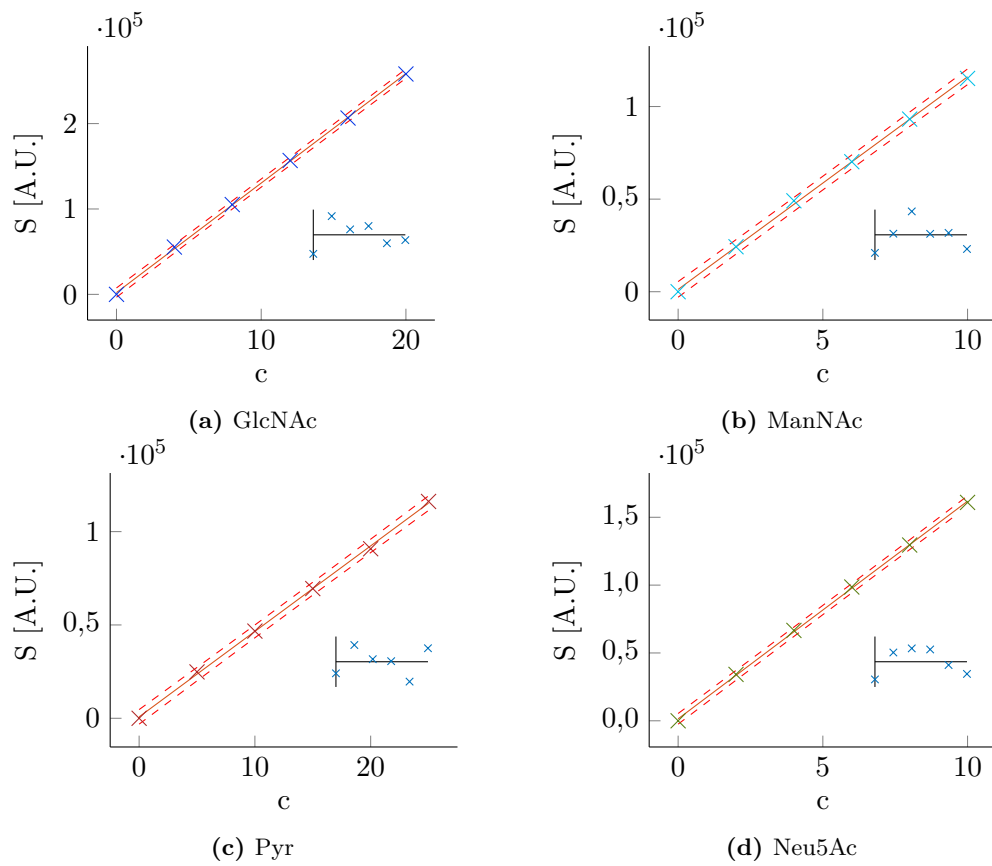


Abbildung A.8: Kalibrationsgeraden für das erste HPLC-System für alle Spezies. Eingezeichnet sind Vertrauensintervalle für 95% Wahrscheinlichkeit. Kalibration wurde in hochreinem Wasser durchgeführt. Im 2. Achsensystem ist jeweils der normierten Fehler gegen die Konzentration aufgetragen.

A.3.2 Zweites HPLC System

Die Kalibration wurde für den Bereich bis 100 mM durchgeführt. Wie auch beim ersten System wurden Proben, welche Reaktoren entnommen wurden, verdünnt, sodass sich die erwarteten Konzentrationen unter 100 mM befanden.

In Tabelle A.10 sind die Statistiken der Kalibrationsgeraden festgehalten (inklusive Gleichung der Ausgleichsgeraden).

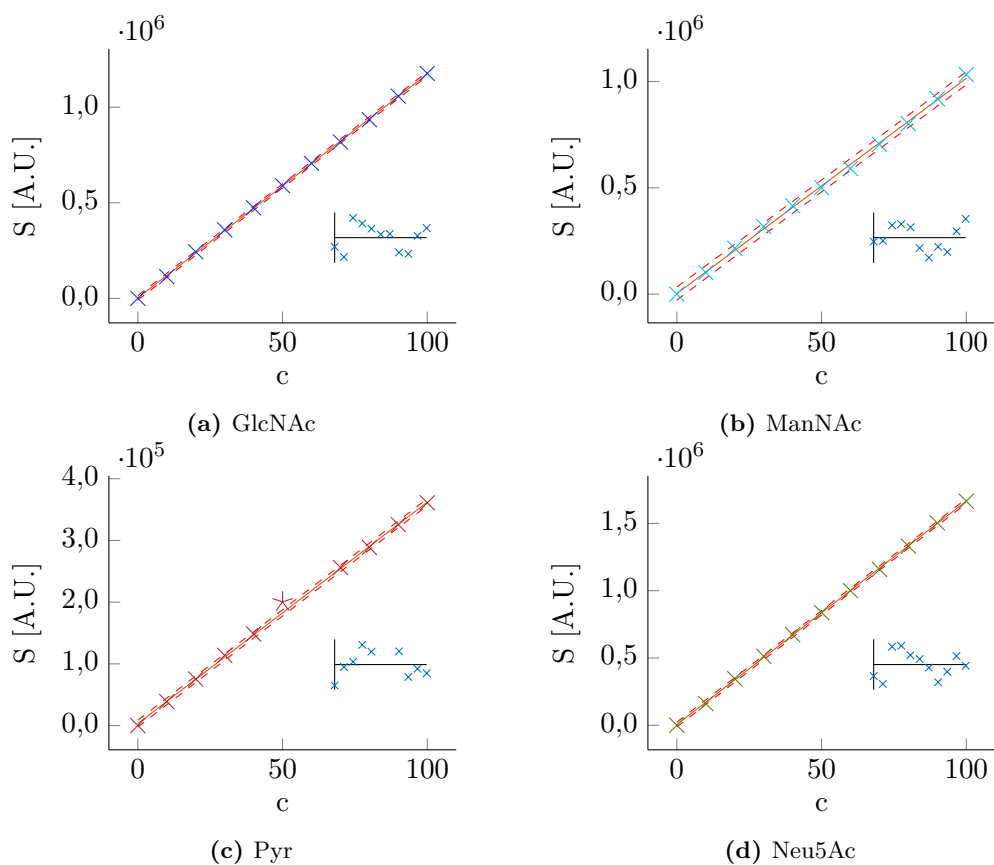


Abbildung A.9: Kalibrationsgeraden für das zweite HPLC-System für alle Spezies. Eingezeichnet sind Vertrauensintervalle für 95% Wahrscheinlichkeit. Kalibration wurde in hochreinem Wasser durchgeführt. Im 2. Achsensystem ist jeweils der normierte Fehler gegen die Konzentration aufgetragen. Der als Stern gekennzeichnete Messwert für Pyr wurde als Ausreißer deklariert und für die Kalibrationsgerade nicht berücksichtigt.

Tabelle A.10: Statistiken zu Abbildung A.9 und typische Retentionszeiten der verschiedenen Komponenten.

Spezies	$s/10^3$	$b/10^3$	$RMSE/10^3$	R^2	t [min]
GlcNAc	$11,71 \pm 0,10$	$2,60 \pm 5,68$	4,46	0,9999	20,0
ManNAc	$10,12 \pm 0,26$	$2,95 \pm 15,10$	11,83	0,9989	18,9
Pyr	$3,59 \pm 0,05$	$3,23 \pm 2,77$	2,04	0,9998	15,5
Neu5Ac	$16,61 \pm 0,15$	$5,13 \pm 8,80$	6,89	0,9999	13,9
KP _i -Puffer					13,4

A.4 Charakterisierung der Druckdaten

Da der Druck in der UHPLC-Pumpe jede Sekunde vermessen wird, stehen nach einem Versuch über 24 h 86 400 Messpunkte zur Verfügung. Um die Dateigrößen der Bilder zu reduzieren wurden die Dichte der Messpunkte so oft halbiert, bis 500 Messpunkte verblieben. Um Druckschwankungen weiterhin originalgetreu abzubilden, wurden lokale Maxima und Minima des Drucks mittels des MATLAB[®]-Befehls `envelope(p, 128, 'peak')` berechnet und in den Abbildungen (zum Beispiel Abbildung 4.37b und Abbildung A.10a) entsprechend dargestellt (MATLAB[®]-Funktion: `PressureDataReducer`).

In Abbildung A.10 wurden die gemessenen Druckdaten in drei Aspekten analysiert: In Abbildung A.10a wurde sowohl der gleitende Durchschnitt von 300 benachbarten Messpunkten (5 min) als auch die lokalen Maxima und Minima dargestellt. Die Streuung der Daten um den gleitenden Mittelwert wurde in dem Histogramm in Abbildung A.10b dargestellt. Die Breite und Anzahl der Klassen wurde hierbei mittels des Interquartilsabstand (IQA) bestimmt [192].

$$b_K = 2 \frac{\text{IQA}}{\sqrt[3]{N_{mess}}} \quad (\text{A.6})$$

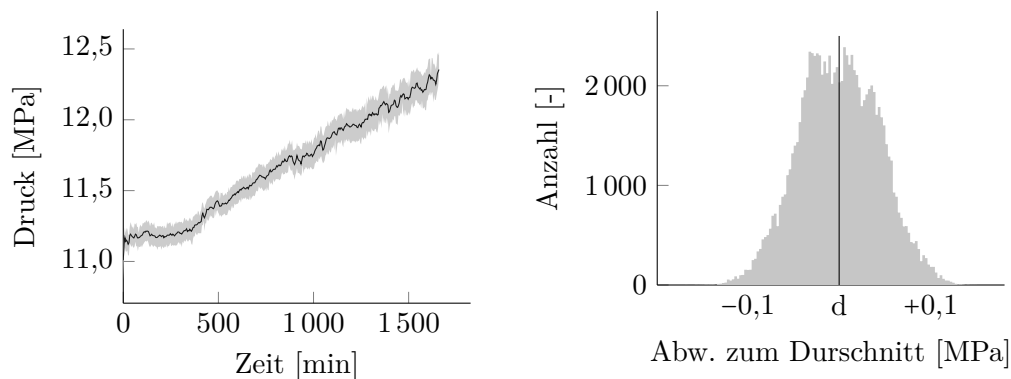
Mit b_K (Einheit entsprechend der zu untersuchenden Variable) als Breite der Klassen und N_{mess} als Anzahl an Messpunkten (dimensionslos). IQA stellt die Differenz zwischen dem 3. und 1. Quantils dar (Einheit entsprechend der zu untersuchenden Variable).

Über die Breite der Klassen wurde die Anzahl der Klassen berechnet:

$$N_K = \frac{\max(x) - \min(x)}{b_K} \quad (\text{A.7})$$

Mit N_K als Anzahl der Klassen (dimensionslos), $\max(x)$ als maximaler Wert der abzubildenden Variable und $\min(x)$ entsprechend der minimale Wert.

Für die Berechnung von Median und Durchschnittliche Abweichung zum Median (MAD) wurden sämtliche Daten verwendet. Diese wurde in MATLAB[®] mittels `median(p)` und `mad(p, 1)` durchgeführt. Hierbei ist p ein Vektor, welcher die gemessenen Druckdaten beinhaltet.



(a) Originaldaten mit gleitendem Durchschnitt (b) Abweichung zwischen Originaldaten und dem Durchschnitt

Abbildung A.10: Verarbeitung der aufgezeichneten Druckdaten

A.5 Matlab-Skripte

Alle Regressionsfunktionen (lineare Regressionsfunktion für die Kalibration, exponentielle Regressionsfunktion bei der Gleichgewichtsverschiebung sowie der geschwindigkeitsausdruck nach Michaelis-Menten) wurden sowohl mittels `cftool`, als auch mit den entsprechenden Funktionen durchgeführt.

A.5.1 Kalibrationsgeraden

```

1 function [fitresult , gof , confi_int , residuals , x_pred_int ,
           pred_Int , delta_prediction] = createFit (X, Y, sds , xName, yName,
           xlimits)
2 %CREATEFIT creates linear fits and also plots residuals and QQ
   plot
3 %
4 %create_Fit takes X and Y data as the input and computes the
   best function
5 %to approximate y=a1*x+a0
6 %
7 %By handing create_Fit the standard deviation (std) of your
   measurments this can
8 %be expanded. In this case weights for the regression will be
   generated
9 %that are the inverse of the std.
10 %meaning that is a point has a high std it will count less for
   the
11 %regression while accurate points (low std) will weight more.

```

A Material und Methoden

```
12 %If std are given the errorbars will be added to the final plot
13 %
14 %Additional inputs:
15 %sds: standard deviations for all points (used as weights for
    fitting)
16 %Name for the xlabel
17 %Name for the ylabel
18 %limits for the xaxis.
19 %
20 % See also FIT, CFIT, SFIT.
21
22
23 %Checking for input
24 %If create_fit is called with only 2 arguments as inputs, the
    rest will be
25 %generated.
26 [xData, yData] = prepareCurveData( X, Y );
27 if ~exist( 'sds', 'var' )
28     sds=ones( size( xData ) );
29     sds_given=false; %will use this later. If std are given,
        plot errorbars
30 else
31     sds_given=true;
32 end
33 if ~exist( 'xName', 'var' ), xName='x'; end
34 if ~exist( 'yName', 'var' ), yName='y'; end
35 if ~exist( 'xlimits', 'var' ), xlimits=[min(xData),max(xData)];
    end
36
37 %% Fit:
38
39
40 % Set up fittype and options.
41 ft = fittype( 'poly1' );
42 %ft = fittype( 'a*x', 'independent', 'x', 'dependent', 'y' );
43
44
45 % Fit model to data.
46 [fitresult, gof] = fit( xData, yData, ft, 'Weights', 1./sds );
47
48 confi_int=confint( fitresult );
49
```

```

50 %disp(confi_int(1,2)-cinfo_int(1,1)
51
52 %% Plot fit with data.
53 fig1=figure( 'Name', 'Calibration' );
54 %fig1=gcf;
55 %%
56 axes1=gca;
57 %axes1=axes('Parent',fig1); %Main plot in theses axes
58 if sds_given
59     errorbar(X,Y,sds,'Parent',axes1,'LineStyle','none','Color'
        ,[0 .45 .74],'Marker','x','MarkerSize',8);
60 else
61
62     h = plot( xData, yData,'x','MarkerSize',8,'Parent',axes1);
63     grid off
64     box off
65 end
66 hold on
67 %x_span=xlimits;
68 y=fitresult.p1*xlimits+fitresult.p2;
69
70
71
72 plot(xlimits,y);
73 xlim(xlimits);
74
75 x_pred_int=linspace(xlimits(1),xlimits(2),25);
76
77 pred_Int=predint(fitresult,x_pred_int,.95);
78 plot(x_pred_int,pred_Int,'r—');
79 %alternativ:
80 %plot(fitresult,xData,yData,'predobs')
81
82 delta_prediction=pred_Int(:,1)-pred_Int(:,2);
83 %delta_prediction wird auch ausgegeben. Dies ist dann der
    Bereich, in
84 %welchem die y-Werte bei gegebenem x-Wert mit einer Chance von
    .95 sein
85 %koennen.
86
87 xlabel(xName);
88 ylabel(yName);
89

```

A Material und Methoden

```
90 if fitresult.p2>0
91     legend( {'Calibration', [ yName ' = ' num2str(fitresult.p1)
          ' * ' xName '+' num2str(fitresult.p2) ], '0.95
          Confidence Intervall'}, 'Location', 'NorthWest' );
92 elseif fitresult.p2<0
93     legend( {'Calibration', [ yName ' = ' num2str(fitresult.p1)
          ' * ' xName ' ' num2str(fitresult.p2) ], '0.95
          Confidence Intervall'}, 'Location', 'NorthWest' );
94 else
95     legend( {'Calibration', [yName ' = ' num2str(fitresult.p1)
          ' * ' xName], '0.95 Confidence Intervall'}, 'Location', '
          NorthWest' );
96 end
97
98 %% disp equation with confi int
99
100 error_p1=(confi_int(1,2)-confi_int(1,1))/2;
101 error_p2=(confi_int(2,2)-confi_int(2,1))/2;
102
103 disp(['(' num2str(fitresult.p1) ' +- ' num2str(error_p1) ') * c +
          ' num2str(fitresult.p2) '+ ' num2str(error_p2)])
104
105
106
107 %% Residuals
108 axis2=axes('Parent',fig1,'Position',[0.594642857142857
          0.185714285714286 0.205357142857143 0.15]);
109
110 residuals=yData-fitresult(xData);
111
112
113 plot(xData,atan(residuals/2/mean(abs(residuals))),'.','Parent',
          axis2);
114
115 % Label axes
116 box(axis2,'off');
117 title(['arctan Residuals ' yName '-fit'])
118 %arctan so see outliers and not change the "real" values while
          also keeping
119 %the scale.
120 %residual plots also don't need yticks and xticks
121 %source: 10.1006/meth.2001.1179
122 axis2.XTick=[];
```

```

123 axis2.YTick=[];
124 axis2.XAxisLocation='origin';
125 figure
126 qqplot(residuals)
127
128 % figure
129 % plot(atan(residuals/2/mean(residuals)), 'x')
130
131 disp('Using the ks test to check residuals for normal
      distribution:')
132 % hypothesis is: residuals are normal distributed
133 %kstest==1 means it is rejected. aka: residuals are NOT normal
134 [res ,pvalue]=kstest((residuals-mean(residuals))/std(residuals))
      ;
135 %kstest compares to STANDARD normal distribution. So we need to
      rescale the
136 %residuals...
137 if res
138     disp(['Residuals are not normally distributed. Likelyhood:
          ' num2str(pvalue) '(smaller value= more doubt on
          hypothesis)'])
139 else
140     disp('Residuals are normally distributed - everything is
          right with the world')
141 end

```

A.5.2 Exponentielle Regression

```

1 function [fitresult , gof ,x_inter ,pred_Int ,plothandle] =
      createFit_exp(x, y)
2 %CREATEFIT1(P,NEU5AC)
3 % Create a fit.
4 %
5 % Data for 'untitled fit 1' fit:
6 %     X Input : p
7 %     Y Output: Neu5Ac
8 % Output:
9 %     fitresult : a fit object representing the fit.
10 %     gof : structure with goodness-of fit info.
11 %
12 % See also FIT, CFIT, SFIT.
13
14 % Auto-generated by MATLAB on 24-Feb-2020 12:46:20
15

```

A Material und Methoden

```
16
17
18 %% Fit: 'untitled fit 1'.
19 [xData, yData] = prepareCurveData( x, y );
20
21 % Set up fittype and options.
22 ft = fittype( 'exp1' );
23 opts = fitoptions( 'Method', 'NonlinearLeastSquares' );
24 opts.Display = 'Off';
25 opts.StartPoint = [0 0 ];
26
27 % Fit model to data.
28 [fitresult, gof] = fit( xData, yData, ft, opts );
29
30
31 confi_int=confint( fitresult )';
32
33 x_inter=linspace( min(x),max(x),100);
34 %x_inter=0:.1:45;
35 pred_Int=predint( fitresult, x_inter, .95);
36
37 %% Berechnung der Fit-Vertrauens-Intervalle
38 %f=figure( 'Name', 'untitled fit 1' );
39
40 plot( x_inter, pred_Int, 'k—' )
41 hold on
42
43 y_fit=fitresult.a*exp( fitresult.b*x_inter);
44 plot( x_inter, y_fit, 'r—' )
45 % Plot fit with data.
46
47 plohandle = plot( fitresult, xData, yData, 'x' );
48 legend( plohandle, 'Neu5Ac vs. p', 'untitled fit 1', 'Location
    ', 'NorthEast' );
49 % Label axes
50 xlabel p
51 ylabel Neu5Ac
52 grid on
```

A.5.3 Michaelis-Menten-Regression

```
1
2 function [fitresult, gof, confi_int, x_pred_int, pred_Int,
    residuals, delta_prediction] = createFit_MM(X, Y, xlimits)
```

```

3  if ~exist('xlimits', 'var'), xlimits=[min(X),max(X)]; end
4
5  %% Fit:
6  [xData, yData] = prepareCurveData( X, Y );
7  ft = fittype( 'vmax*x./(KM+x)', 'independent', 'x', 'dependent',
8              , 'y' );
9  opts = fitoptions( 'Method', 'NonlinearLeastSquares' );
10 opts.Display = 'Off';
11 opts.StartPoint = [max(xData)/2 max(yData)];
12 [fitresult, gof] = fit( xData, yData, ft, opts );
13 confi_int=confint(fitresult)';
14 %% Plot fit with data.
15 fig1=figure( 'Name', 'Calibration' );
16 %fig1=gcf;
17 %%
18 axes1=gca;
19 h= plot( xData, yData, 'x', 'MarkerSize',8, 'Parent', axes1);
20 hold on
21 x_pred_int=linspace(0, xlimits(2),25);
22 y=fitresult.vmax*x_pred_int./( fitresult.KM+x_pred_int);
23 plot(x_pred_int,y );
24 xlim(xlimits);
25 pred_Int=predint(fitresult, x_pred_int, .95);
26 plot(x_pred_int, pred_Int, 'r—');
27 delta_prediction=pred_Int(:,1)-pred_Int(:,2);
28 axis2=axes( 'Parent', fig1, 'Position', [0.594642857142857
29         0.185714285714286 0.205357142857143 0.15]);
30 %% Residuals
31 residuals=yData-fitresult(xData);
32 plot(xData, atan(residuals/2/mean(abs(residuals))), '.', 'Parent',
33      axis2);
34 box(axis2, 'off');
35 title(['arctan Residuals ' yName '-fit'])
36 %arctan so see outliers and not change the "real" values while
37   also keeping
38 %the scale.
39 %residual plots also don't need yticks and xticks
40 %source: 10.1006/meth.2001.1179
41 axis2.XTick=[];
42 axis2.YTick=[];
43 axis2.XAxisLocation='origin';

```

A Material und Methoden

```
42 figure
43 qqplot(residuals)
44
45 % figure
46 % plot(atan(residuals/2/mean(residuals)), 'x')
47
48 disp('Using the ks test to check residuals for normal
      distribution:')
49 % hypothesis is: residuals are normal distributed
50 %kstest==1 means it is rejected. aka: residuals are NOT normal
51 [res , pvalue]=kstest((residuals - mean(residuals))/std(residuals))
      ;
52 %kstest compares to STANDARD normal distribution. So we need to
      rescale the
53 %residuals...
54 if res
55     disp(['Residuals are not normally distributed. Likelihood:
          ' num2str(pvalue) ' (smaller value= more doubt on
          hypothesis)'])
56 else
57     disp('Residuals are normally distributed - everything is
          right with the world')
58 end
```

A.5.4 Numerische Ableitung (Verweilzeitverteilung)

```
1 function [dy] = numeric_der(x,y)
2 %Berechnung Ableitung numerisch. Stuetzstellen muessen gleichen
      Abstand
3 %haben
4
5 dy(1)=(y(2)-y(1))/(x(2)-x(1));
6 N=length(y);
7 dy(N)=(y(N)-y(N-1))/(x(N)-x(N-1));
8
9 for i=2:N-1
10     dy(i)=0.5*(y(i+1)-y(i-1))/(x(i+1)-x(i));
11 end
12
13 end
```

A.5.5 Basislinienkorrektur

```
1 function Manual_BLC(t,S)
2 %GUI zur Basislinienkorrektur.
```

```

3  %Vor dem Funktionsaufruf sollten globale Variablen tg, Sg,
   S_new angelegt
4  %sein.
5  global tg Sg t1_ind t2_ind S_new
6  tg=t;
7  Sg=S;
8  plot(t,S)
9  btn2=uicontrol('Style','pushbutton','String','BLC!','...
10      'Callback',@get_peak,...
11      'Units','normalized','Position',[0.92 0.1 0.08 .8]);
12 end
13
14 function S_new=get_peak(source,event)
15 global tg Sg t_peak t1_ind t2_ind S_new
16
17 t_peak=xlim;
18 t1=t_peak(1);
19 t2=t_peak(2);
20 %S_peak=y(tg>t1&tg<t2);
21 [~,t1_ind]=min(abs(tg-t1));
22 [~,t2_ind]=min(abs(tg-t2));
23 S_new=Sg;
24 S_new(1:t1_ind)=0;
25 S_new(t2_ind:end)=0;
26 y1=Sg(t1_ind);
27 y2=Sg(t2_ind);
28
29 %Geradengleichung  $y=m*t+c$ 
30 % $y1=m*t1+c$ 
31 % $y2=m*t2+c$ 
32 y=[y1;y2];
33 A=[t1 1; t2 1];
34 line_params=A\y;
35 m=line_params(1);
36 c=line_params(2);
37
38 line=m*tg(t1_ind:t2_ind)+c; %the line to be subtracted
39 hold on
40 plot(tg(t1_ind:t2_ind),line, '—')
41 S_new(t1_ind:t2_ind)=Sg(t1_ind:t2_ind)-line;
42
43 figure
44 plot(tg,S_new);

```

45 **end**

A.5.6 Simulation des Reaktionsfortschrittes

```

1  global HighPressure mEpi mAldo
2  HighPressure=false;
3  mEpi=0.057;%gTr
4  mAldo=0.1798; %gTr
5  c0=[.5 0 0.3 0]; %mol/L Startkonzentration
6  tspan=[0 15*60]; %min
7
8  t_interpol=0:1:max(tspan);
9  c0G=0:.1:.5;
10 c0P=0:.1:0.7;
11 [C0G,C0P]=meshgrid(c0G,c0P);
12 t_crit=zeros(size(C0G));
13
14 for i=1:length(c0G)
15     for j=1:length(c0P)
16         c0=[c0G(i) 0 c0P(j) 0];
17         HighPressure=true;
18         [toutHD,CHD]=ode45(@kinetic,tspan,c0);
19         HighPressure=false;
20         [toutATM,CAIM]=ode45(@kinetic,tspan,c0);
21
22         cNeuHD=interp1(toutHD,CHD(:,4),t_interpol);
23         cNeuATM=interp1(toutATM,CAIM(:,4),t_interpol);
24         press_benefit=find(cNeuHD>cNeuATM);
25         if isempty(press_benefit)
26             t_crit(j,i)=NaN;
27         else
28             t_crit(j,i)=press_benefit(1);
29         end
30     end
31 end
32 surf(C0G,C0P,t_crit)
33 xlabel('GlcNac')
34 ylabel('Pyr')
35 zlabel('Kritische Zeit')
36
37 function dc=kinetic(t,c)
38 global mEpi mAldo
39 %c: Glc, Man, Pyr, Neu5Ac
40 dc=[0,0,0,0]';

```

```

41 V_ges=7e-3;
42 cEpi=mEpi/V_ges;
43 cAldo=mAldo/V_ges;
44 vEpi=Epi_Kinetik(c,cEpi);
45 vAldo=Aldo_Kinetik(c,cAldo);
46 dc(1)=-vEpi;
47 dc(2)=+vEpi-vAldo;
48 dc(3)=-vAldo;
49 dc(4)=vAldo;
50 end
51
52 function vAldo=Aldo_Kinetik(c,cAldo)
53 global HighPressure
54 if ~HighPressure
55     %Niedrigdruck:
56     vmaxhin=650e-6; %mol/min/gTr
57     KMMan=0.23;
58     KMPyr=0.091;
59     vmaxruck=743e-6; %mol/min/gTr
60     KMNeu=0.650;
61 else
62     %Hochdruck:
63     vmaxhin=630e-6; %mol/min/gTr
64     KMMan=0.320;
65     KMPyr=0.037;
66     vmaxruck=403e-6; %mol/min/gTr
67     KMNeu=0.365;
68 end
69 num=cAldo*(vmaxhin*c(2)*c(3)/KMMan/KMPyr-vmaxruck*c(4)/KMNeu);
70 denom=1+c(3)/KMPyr+c(2)*c(3)/KMMan/KMPyr+c(4)/KMNeu;
71 vAldo=num./denom;
72 end
73
74 function vEpi=Epi_Kinetik(c,cEpi)
75 global HighPressure
76 if ~HighPressure
77     %Niedrigdruck:
78     vmaxhin=1324e-6; %mol/min/gTr
79     KMGlc=0.195; %mol/L
80     vmaxruck=660e-6; %mol/min/gTr
81     KMMan=0.016;
82     KIPyr=0.106;
83 else

```

A Material und Methoden

```
84     %Hochdruck :
85     vmaxhin=1388e-6; %mol/min/gTr
86     KMGlc=0.193; %mol/L
87     vmaxruck=740e-6; %mol/min/gTr
88     KMMan=0.024;
89     KIPyr=0.043;
90 end
91 num=cEpi*(vmaxhin*c(1)/KMGlc-vmaxruck*c(2)/KMMan);
92 denum=1+c(1)/KMGlc+c(2)/KMMan+c(3)/KIPyr;
93 vEpi=num/denum;
94 end
```

A.5.7 Berechnung optimales Enzym-Verhältnis

```
1
2
3 global alpha compare_value_conversion
4 compare_value_conversion=0.9; %once concentration reaches 90%
   of end-concentration (equilibrium)
5 %alpha is amount of Enzyme E to total amount. NOT Enzyme E /
   Enzyme A
6 alpha0=0.99;
7
8 alpha_fastest=fminsearch(@GetTime,alpha0);
9 function Time_to_90=GetTime(alpha0)
10     global alpha compare_value_conversion
11
12     alpha=alpha0; %intentionalle lets without ; for printing
13
14     if alpha<0 || alpha>1 %Condition: alpha between 0 and 1
15         Time_to_90=Inf;
16
17     else
18         %initial concentrations
19         c0=[300 0 300 0]; %mM
20
21         c0=c0/1000; %M
22
23
24         tspan=[0 50000];
25
26         [tout,C]=ode45(@Kin,tspan,c0);
27
28         plot(tout,C)
```

```

29
30     final_conc=C(end,4); %has to be equilibrium!
31     find_ind=find(C(:,4)>compare_value_conversion*
32         final_conc); % first time Neu5Ac-concentration
33         reaches 90% of equilibrium-concentration
34     Time_to_90=tout(find_ind(1));
35 end
36 end
37
38 function [ dc ] = Kin( t ,c)
39 %KIN differential equations for the kinetic
40 global alpha
41 %Total enzyme mass
42 c_ges=1; %gTr/L
43 c_E=alpha*c_ges;
44 c_A=(1-alpha)*c_ges;
45
46 cG=c(1);
47 cM=c(2);
48 cP=c(3);
49 cN=c(4);
50
51 %Epimerase
52 vhin=1324e-6*c_E;
53 vrueck=660e-6*c_E;
54 KMG=0.195;
55 KMM=0.016;
56 KMP=0.109;
57 v_Epi=(vhin*cG/KMG-vrueck*cM/KMM)/(1+cG/KMG+cM/KMM+cP/KMP);
58
59 %Aldolase
60
61 vhin=650e-6*c_A;
62 vrueck=743e-6*c_A;
63 KMM=0.23;
64 KMP=0.091;
65 KMN=0.650;
66
67 v_Aldol=(vhin*cM*cP/KMM/KMP-vrueck*cN/KMN)/(1+cP/KMP+cM*cP/KMM/
68     KMP+cN/KMN);

```

A Material und Methoden

```
69
70 %differential equations.
71 dc(1)=-v_Epi;
72 dc(2)=+v_Epi-v_Aldol;
73 dc(3)=-v_Aldol;
74 dc(4)=+v_Aldol;
75
76 dc=dc';
77
78 end
```

A.5.8 Berechnung des Umsatzes für den kontinuierlichen Umlaufreaktor

```
1 global cin dotV VRea mAldo mEpi
2 cin=[.3 0 .3 0];
3 dotV=1e-3; %L/min
4 VRea=7e-3; %L
5 mEpi=0.05;
6 mAldo=0.2581;
7 cEpi=mEpi/VRea;
8
9 options = optimoptions('fsolve','FunctionTolerance',1e-9,'
    StepTolerance',1e-9);
10
11 for i=1:100
12     Cstat0=cin;
13     Cstat(:,i)=fsolve(@f,Cstat0,options);
14     %Cstat: Stationaere Konzentration
15     X(i)=1-Cstat(1,i)/cin(1);
16 end
17
18
19 function errors=f(cout)
20
21 global cin dotV VRea mAldo mEpi
22 cEpi=mEpi/VRea;
23 cAldo=mAldo/VRea;
24
25 vEpi=Epi_Kinetik(cout,cEpi);
26 vAldo=Aldo_Kinetik(cout,cAldo);
27
28 errors(1)=cin(1)*dotV-cout(1)*dotV-VRea*vEpi;
29 errors(2)=-cout(2)*dotV+VRea*vEpi-VRea*vAldo;
30 errors(3)=cin(3)*dotV-cout(3)*dotV-VRea*vAldo;
```

```

31 errors(4)=-cout(4)*dotV+VRea*vAldo;
32 errors=1e3*errors;
33 %Mal 1000 um es sensitiver zu machen
34 end
35
36 function vAldo=Aldo_Kinetik(c,cAldo)
37 vmaxhin=630e-6; %mol/min/gTr
38 KMMan=0.320;
39 KMPyr=0.037;
40 vmaxruck=403e-6; %mol/min/gTr
41 KMNeu=0.365;
42 num=cAldo*(vmaxhin*c(2)*c(3)/KMMan/KMPyr-vmaxruck*c(4)/KMNeu);
43 denom=1+c(3)/KMPyr+c(2)*c(3)/KMMan/KMPyr+c(4)/KMNeu;
44 vAldo=num./denom;
45 end
46
47 function vEpi=Epi_Kinetik(c,cEpi)
48 vmaxhin=1324e-6; %mol/min/gTr
49 KMGlC=0.195; %mol/L
50 vmaxruck=740e-6; %mol/min/gTr
51 KMMan=0.024;
52 KIPyr=0.060;
53 num=cEpi*(vmaxhin*c(1)/KMGlC-vmaxruck*c(2)/KMMan);
54 denum=1+c(1)/KMGlC+c(2)/KMMan+c(3)/KIPyr;
55 vEpi=num/denum;
56 end

```

A.5.9 Höhenlinien von Gleichgewichtsumsatz und Gewinn

Für die Darstellung können die Variablen X (Umsatz), Gewinn oder RelGewinn gewählt werden.

```

1
2 Ps=linspace(0,130e6,25);
3 alphas=linspace(0.5,3.5,25);
4
5 [PPs,aalphas]=meshgrid(Ps,alphas);
6
7 cG0=0.25;
8
9 X=zeros(25,25);
10 Gewinn=zeros(25,25);
11
12 for p=1:25
13     for a=1:25

```

A Material und Methoden

```
14         X(p, a)=X_fun(Ps(p), alphas(a), cG0);
15         Gewinn(p, a)=Gewinn_fun(Ps(p), alphas(a), cG0);
16     end
17 end
18
19 RelGewinn=Gewinn./Gewinn(1,:); %Gewinn bezogen auf den Gewinn
    bei dem Verhaeltnis bei 0 MPa.
20
21 contour(aalphas, PPs/1e6, X', 'ShowText', 'on')
22 hold on
23 contour(aalphas, PPs/1e6, RelGewinn', 'ShowText', 'on')
24
25 %Test=Gewinn_fun(linspace(0, 3500e6, 40), 1, 1);
26
27 function erg = X_fun(p, alpha, cS1)
28 %F Summary of this function goes here
29 % Detailed explanation goes here
30 %erg=x.^2+y+sin(z);
31 %erg=sin(x-z)+sin(x);
32
33
34 K0=0.23*20.87;
35 DeltaV=-1.6e-5;
36 T=313;
37 K=K0*exp(-DeltaV/R_gas/T*p);
38
39 erg=0.5*(1+alpha+1./cS1./K)-sqrt(0.25*(1+alpha+1./cS1./K).^2-
    alpha);
40
41
42 end
43
44 function erg = Gewinn_fun(p, alpha, cS1)
45 %F Summary of this function goes here
46 % Detailed explanation goes here
47 %erg=x.^2+y+sin(z);
48 %erg=sin(x-z)+sin(x);
49 dotV=2e-6/60; %m^3/s - kuerzt sich zwar raus, nehmen wir aber
    mal mit.
50
51
52 K0=0.23*20.87;
53 DeltaV=-1.6e-5;
```

```

54 T=313;
55 K=K0*exp(-DeltaV/R_gas/T*p);
56
57 X=0.5*(1+alpha+1./cS1./K)-sqrt(0.25*(1+alpha+1./cS1./K).^2-
    alpha);
58
59 PreisSubstrat1=0.1;
60 PreisSubstrat2=0.12; %Euro/g
61
62 KostenSubstrate=PreisSubstrat1*221.21*dotV*cS1;
63 KostenSubstrate=KostenSubstrate+PreisSubstrat2*110.04*dotV*cS1*
    alpha;
64
65 PreisProdukt=5; %Euro/g
66
67 KostenWattstunde=0.27e-3/3600; %0.27Euro/kWh
68
69 KostenWatt=0.00000008; %Euro/Ws
70 %KostenWatt=0.047/1000/3600;
71 KostenDruck=KostenWatt*p*dotV;
72
73 Einkommen=PreisProdukt*309*X*alpha*cS1*dotV; %Erinnere: X(P)
74 Gewinn=Einkommen - KostenDruck - KostenSubstrate;
75 erg=Gewinn;
76
77 end
78
79 %

```

A.5.10 Wirtschaftlichkeitsanalyse mittels Gleichgewichtsumsatz

```

1 %A + B <-> C
2 A0=1; %Startkonzentrationen
3 B0=1;
4 Px=linspace(0,5e9,50); %Druck Pa
5 deltaV=-16e-6; %m^3/mol
6 PreisProdukt=3.24; %Euro/g
7 dotV=2e-6/60; %m^3/s
8 KostenWatt=0.00000008; %Euro/Ws
9 T=40+273.15;
10 M_P=309; %g/mol molare Masse Produkt
11
12 K0s=[.1 .5 1 5 10 25 50];

```

A Material und Methoden

```
13 %alphas=[1 1.5 2 2.5];
14 %deltaVs=[-20 -10 -5 0 10]*1e-6;
15 %PreisProdukte=[100 200 300 500 750 1000];
16
17 alpha=B0/A0;
18 for K0=K0s
19 K=K0*exp(-deltaV*Px/R_gas/T);
20 X=0.5*(1+alpha+A0./K)-sqrt((0.5*(1+alpha+A0./K)).^2-alpha);
21
22 %% Kostenanalyse
23 KostenDruck=KostenWatt*Px*dotV;
24 Einkommen=PreisProdukt*X*A0*M_P*dotV; %Erinnere: X(P)
25 plot (Px/1e6, Einkommen-KostenDruck)
26 hold on
27 xlabel('Druck [MPa]')
28 ylabel('Einkommen - Kosten [Euro/s]')
29 end
```

A.5.11 Import der Druckdaten

```
1 function [xdata,ydata] = import_UHPLC_pressure_file()
2 %Liest die Ausgabe von der UHPLC ein.
3 [filename, path]=uigetfile('D:\ITB_PRAKTI_Jannis\Jar\
   Aufzeichnung\*.*)');
4 content=importfile([path '\ ' filename]);
5
6 i=1;
7 %Daten fangen mit "LC Status Trace" an.
8 while ~contains(content(i,1), 'LC Status Trace')
9     i=i+1;
10 end
11 %Ab hier "# of Points" suchen. Zeile darunter ist Anzahl der
    Messwerte
12
13 while ~contains(content(i,1), '# of Points')
14     i=i+1;
15 end
16 num_Points=str2double(content(i,2));
17
18 while ~contains(content(i,1), 'Intensity Multiplier')
19     i=i+1;
20 end
21 Intens_Multiplier=str2double(strrep(content(i,2), ',', '.')); %
22
```

```

23 while ~contains(content(i,1), 'R.Time (min)')
24     i=i+1;
25 end
26 data_start=i+1;
27
28 data_end=data_start+num_Points-1; %-1 da wir sonst in den
    Anfang des naechsten Blocks reinrutschen
29
30 xdata_str=strrep(content(data_start:data_end,1),',','.'');
31 xdata=str2double(xdata_str);
32 ydata_str=strrep(content(data_start:data_end,2),',','.'');
33 ydata=str2double(ydata_str)*Intens_Multiplier;
34
35 fprintf('Es wurden %i Daten importiert (%i. Zeile bis %i. Zeile
    )\n',num_Points,data_start,data_end)
36 disp(' [x]=min; [y]=MPa')
37
38 end
39
40
41 function filecontent = importfile(filename)
42 % Auto-generated by MATLAB on 2020/07/03 07:38:05
43 delimiter = '\t';
44 startRow = 1;
45 endRow = inf;
46 formatSpec = '%q%q%[\n\r]';
47 fileID = fopen(filename, 'r');
48 textscan(fileID, '%[\n\r]', startRow(1)-1, 'WhiteSpace', '', '
    ReturnOnError', false);
49 dataArray = textscan(fileID, formatSpec, endRow(1)-startRow(1)
    +1, 'Delimiter', delimiter, 'TextType', 'string', '
    ReturnOnError', false, 'EndOfLine', '\r\n');
50 for block=2:length(startRow)
51     frewind(fileID);
52     textscan(fileID, '%[\n\r]', startRow(block)-1, 'WhiteSpace
        ', '', 'ReturnOnError', false);
53     dataArrayBlock = textscan(fileID, formatSpec, endRow(block)
        -startRow(block)+1, 'Delimiter', delimiter, 'TextType',
        'string', 'ReturnOnError', false, 'EndOfLine', '\r\n');
54     for col=1:length(dataArray)
55         dataArray{col} = [dataArray{col};dataArrayBlock{col}];
56     end
57 end

```

```
58 fclose (fileID);
59 filecontent = [dataArray{1:end-1}];
60 end
```

A.5.12 Reduzierung der Datendichte von einer Druckdatei

```
1 function [tn,pn,phn,pln] = PressureDataReducer(t,p,max_points)
2 %Halbiert die Anzahl an Messwerten so lange, bis die Anzahl
   %kleiner als die
3 %zugelassene Anzahl ist (max_points)
4 %Gibt zusaetzlich lokale Ober- und Unterschranken aus.
5 %tn: t neu
6 %pn: p neu
7 %phn: p high neu
8 %pln: p low neu
9 [phn, pln] = envelope(p,128,'peak');
10
11 tn=t;
12 pn=p;
13 counter=0;
14 if ~exist('max_points','var'), max_points=500; end
15
16 while length(phn)>max_points
17     phn=phn(1:2:end);
18     pln=pln(1:2:end);
19     tn=tn(1:2:end);
20     pn=pn(1:2:end);
21     counter=counter+1;
22 end
23
24 disp(['I reduced the size ' num2str(counter) ' times by 2
   %making a reduction of 1:' num2str(2^counter) '.'])
25
26 tfill=[tn; flip(tn)];
27 pfill=[phn; flip(pln)];
28 fill(tfill,pfill,[0 0 0],'LineStyle','none')
29 hold on
30 plot(tn,pn)
31
32 end
```

B Zusätzliche Informationen

B.1 Kritische Reynolds-Zahlen

In Tabelle B.1 sind verschiedene kritische Reynolds-Zahlen und die berechneten Werte für das System festgehalten. Bei der Berechnung der Reynolds-Zahl des Festbetts wurden die Partikel nicht berücksichtigt. Da die VZV hinreichend eng war, wäre auch eine turbulente Strömung möglich.

Tabelle B.1: Berechnete Reynolds-Zahlen. Gerechnet mit 2 mL/min, 1000 kg/m³ und 1 mPas.

Bauteil	Re	Krit.
Festbett \varnothing 3 mm	14	200 [193]
Kapillare \varnothing 25 μ m	1 700	2 300 [143]
Kapillare \varnothing 50 μ m	850	2 300 [143]

B.2 Weitere Abhängigkeiten der Gleichgewichtskonstanten

In Abschnitt 3.2 wird unter anderem die Annahme getroffen, dass die Konzentration der Reaktanten hinreichend klein ist, sodass die Konzentration und der Molbruch als proportional und die Aktivitätskoeffizienten als 1 angenommen werden können. Um dies zu überprüfen wurden beide Reaktionen bei niedrigen Konzentrationen (10 mM anstelle von bis zu 500 mM) durchgeführt. Zudem wurde nach Erreichen des Gleichgewichts MgCl_2 zugegeben, um zu prüfen, ob dies die Lage des Gleichgewichts beeinflusst. Die Konzentration des Puffers wurde dabei wie bei anderen Versuchen zu 100 mM gewählt.

Aufgrund der hohen Pufferkonzentration konnte die Konzentration an Neu5Ac nicht bestimmt werden. Zusätzlich ist das Signal für Pyr bei niedrigen Konzentrationen ungenau. Aus diesem Grund wurde nur die Lage des Gleichgewichts der Epimerase in Abbildung B.1 aufgezeichnet.

Die Angabe der abschließenden MgCl_2 -Konzentration kann nicht exakt gemacht werden, da das Arbeitsvolumen des Vorlagenbehälters während des Versuches nicht genau zu bestimmen war. Mittels des Füllstands wurde es zu 2,1 mL im Vorlagenbehälter bestimmt (zuzüglich 5 mL durch den Rest des Systems).

Aus den Versuchen mit hohen Konzentrationen wurden ebenfalls Werte für K_{Epi} um 0,25 bestimmt. Aus diesem Grund wurde geschlossen, dass die Annahme einer starken Verdünnung zulässig war.

Anschließend wurde diese Lösung mit MgCl_2 versetzt. Wie aus der berechneten Gleichgewichtskonstante hervorgeht, ist der Einfluss vernachlässigbar. Molla und Mitarbeiter haben den Einfluss von MgCl_2 die Aktivität einer Glycerinkinase untersucht und stellten fest, dass das Verhältnis von ATP zu MgCl_2 ausschlaggebend ist [194]. Glonek untersuchte die Kombination von ATP und MgCl_2 und stellte fest, dass ein Mg^{2+} -ATP-Komplex gebildet wird [195]. Die Lage des Gleichgewichts sei nicht beeinflusst [196].

Zwar konnte die Gleichgewichtskonstante der Aldolase nicht direkt bestimmt werden, da jedoch die Konzentrationen von GlcNAc und ManNAc konstant blieben, konnte ein Einfluss von MgCl_2 auf das Gleichgewicht der Aldolase ausgeschlossen werden.

B.2.1 Selektivität von Folgereaktionen

Der Druck kann auch einen Einfluss auf die Selektivität von Folgereaktionen haben.

$$S = \frac{c_N}{c_M + c_N} \quad (\text{B.1a})$$

$$= \frac{1}{1 + \frac{c_M}{c_N}} \quad (\text{B.1b})$$

$$K_{Aldol} = \frac{c_N}{c_M \cdot c_P} \quad (\text{B.2a})$$

$$\frac{c_M}{c_N} = \frac{1}{c_P \cdot K_{Aldol}} \quad (\text{B.2b})$$

B.2 Weitere Abhängigkeiten der Gleichgewichtskonstanten

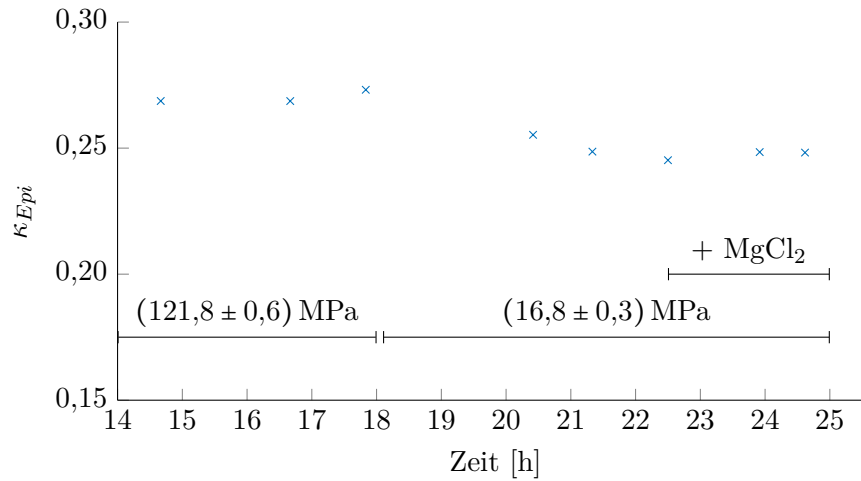


Abbildung B.1: Bestimmte Gleichgewichtskonstante der Epimerase bei niedrigen Konzentrationen und verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen. Die Konzentration von MgCl_2 betrug zu Beginn 1 mM. Nach 23 h wurde sie durch Hinzufügen von 4 mg auf 5,9 mM erhöht. Bedingungen: Reaktorvolumen: 0,21 mL mit 57 mg Epimerase und 0,7 mL mit 179,8 mg Aldolase, 40 °C, 10 mM GlcNAc, 10 mM Pyr, 1 mM ATP, Flussrate 2 mL/min, 100 mM Puffer bei einem pH-Wert von 7,5.

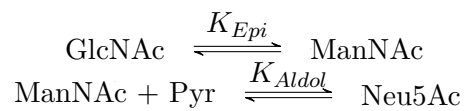


Abbildung B.2: Verwendete Reaktionssequenz

B Zusätzliche Informationen

$$S(p) = \frac{1}{1 + \frac{1}{c_P \cdot K_{Aldol}(p)}} = \frac{c_P \cdot K_{Aldol}(p)}{1 + c_P \cdot K_{Aldol}(p)} \quad (\text{B.3})$$

Über K_{Aldol} ist die Selektivität vom Druck abhängig.

C Ergänzungen zu Formeln

C.1 Fehlerfortpflanzung nach DIN 1319-3

Fehlerfortpflanzung wurde nach DIN 1319-3 durchgeführt [197]. Beispielhaft sei hier das Vorgehen mit zwei Messwerten x und y (mit Mittelwert \bar{x} und \bar{y} sowie Unsicherheiten Δ_x und Δ_y), welche zu einem neuen Wert zusammengerechnet werden sollen.

$$x = \bar{x} \pm \Delta_x \quad (\text{C.1a})$$

$$y = \bar{y} \pm \Delta_y \quad (\text{C.1b})$$

$$z = f(x, y) \quad (\text{C.2})$$

Für die neue Größe z soll der Mittelwert und die Unsicherheit bestimmt werden.

$$z = \bar{z} \pm \Delta_z \quad (\text{C.3})$$

Der Mittelwert berechnet sich durch die Mittelwerte der beiden Eingangsparameter.

$$\bar{z} = f(\bar{x}, \bar{y}) \quad (\text{C.4})$$

Dann wird der Fehler der Größe z (Δ_z) wie folgt bestimmt:

$$\Delta_z = \sqrt{f_x(\bar{x}, \bar{y})^2 \cdot \Delta_x^2 + f_y(\bar{x}, \bar{y})^2 \cdot \Delta_y^2} \quad (\text{C.5})$$

$f_x(x, y)$ beschreibt die Ableitung von f nach x , welche an der Stelle (x, y) ausgewertet wird.

Die Unsicherheit wird mittels der Standardabweichung berechnet (hier exemplarisch für die Größe x):

$$\Delta_x = \frac{\sigma_x}{\sqrt{N_{mess}}} = \frac{1}{\sqrt{N_{mess}}} \sqrt{\frac{1}{N_{mess} - 1} \sum_{i=1}^{N_{mess}} (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{C.6})$$

Mit σ_x als Standardabweichung von dem Messwert x und N_{mess} als Anzahl an Messpunkten/Wiederholungen.

C.2 Massenbilanz im Strömungsrohr

In Kapitel 3 wird unter anderem die Differentialgleichungen (DGL) zur Beschreibung gezeigt. Die DGL für Kinetik kann in DGL für das Rohr überführt werden, indem entweder eine Stoffbilanz um ein Volumenelement gemacht wird, oder, indem Strecke, Zeit und Strömungsgeschwindigkeit verknüpft werden. Hierbei wird angenommen, dass die Strömung homogen ist und keine Diffusion in axialer Richtung stattfindet.

$$\frac{dx}{dt} = w \quad (\text{C.7a})$$

$$\frac{dx}{w} = dt \quad (\text{C.7b})$$

Alternativ kann eine Molbilanz um das in Abbildung C.1 markierte Volumenelement aufgestellt werden:

$$\frac{dn(x)}{dt} = \dot{n}(x) - \dot{n}(x + dx) \pm v \cdot dV \quad (\text{C.8})$$

Da ein Strömungsrohr stationär arbeitet, gibt es keine Änderung mit der Zeit. Des Weiteren kann dV ersetzt werden zu:

$$dV = A \cdot dx \quad (\text{C.9})$$

Für $\dot{n}(x + dx)$ wird dann eine Taylor-Reihen-Entwicklung durchgeführt:

$$\dot{n}(x + dx) = \dot{n}(x) + \frac{d\dot{n}(x)}{dx} dx + \dots \quad (\text{C.10})$$

Unter Vernachlässigung der höheren Ableitungen und Einsetzen in Gleichung (C.8) ergibt sich:

$$0 = \dot{n}(x) - \dot{n}(x) - \frac{d\dot{n}}{dx} dx \pm v \cdot A_c dx \quad (\text{C.11})$$

Anschließend wird der Molenstrom (\dot{n}) durch den Volumenstrom, welcher konstant ist, und die Konzentration ersetzt.

$$\dot{n} = c \cdot \dot{V} \quad (\text{C.12})$$

Außerdem wird die Strömungsgeschwindigkeit über Querschnitt und Volumenstrom berechnet.

$$\dot{V} = A_c \cdot w \quad (\text{C.13})$$

Somit ergibt sich:

$$\frac{dc}{dx} = \pm v \frac{A_c}{\dot{V}} = \pm \frac{v}{w} \quad (\text{C.14})$$

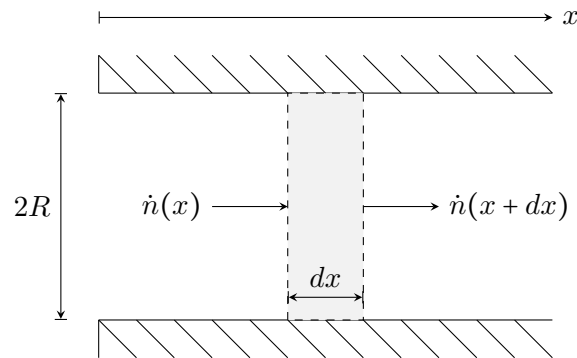


Abbildung C.1: Ein beliebig-kleines Volumenelement in einem Rohrreaktor (vergleiche Abbildung 3.6)

C.3 Dirac-Puls und Heaviside-Stufenfunktion

Der Dirac-Puls ist definiert als Funktion, die bei 0 gegen ∞ strebt und sonst 0 ist. Das Integral des Dirac-Pulses ist die Heaviside-Stufenfunktion ($H_s(x)$).

Diese ist wie folgt definiert:

$$H_s(x) = \begin{cases} 0 & x < 0 \\ \frac{1}{2} & x = 0 \\ 1 & x > 0 \end{cases} \quad (\text{C.15})$$

C.4 Numerische Faltung zweier Funktionen

Die VZV zweier hintereinander geschalteter Reaktoren (E_{ges}) mit VZV der einzelnen Reaktoren E_1 und E_2 wird wie folgt berechnet:

$$E_{ges}(t) = \int_0^t E_1(x) \cdot E_2(t-x) dx \quad (\text{C.16})$$

Diskret bedeutet es, dass die Messpunkte von E_1 von 0 bis i mit den Messpunkten von E_2 von i bis 0 multipliziert und anschließend integriert werden. Dies wurde durch folgenden MATLAB®-Befehl realisiert: `Eges(i)=trapz(t(1:i),E1(1:i).*flip(E2(1:i)))`

C.5 Viskosität in Abhängigkeit von Druck und Temperatur

In Tabelle C.1 ist eine Auswahl an Werten für die dynamische Viskosität von Wasser aufgeführt. Aus diesen wird deutlich, dass Temperatur einen größeren Einfluss auf die Viskosität hat als der Druck.

Tabelle C.1: Werte für die dynamische Viskosität von Wasser [90]

T [°C]	p[MPa]	η [mPa s]
20	0,1	1.0016
40	0,1	0.6527
50	0,1	0.5465
50	100,0	0.5701

Abkürzungsverzeichnis

α -Glc	α -Glucose
β -Glc	β -Glucose
ATP	Adenosin triphosphat
DAD	Dioden Array Detector
DGL	Differentialgleichung
GALAB	GALAB Laboratories GmbH
GGW	Gleichgewicht
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAPWS	Internationale Vereinigung zu den Eigenschaften von Wasser und Dampf
ID	Innendurchmesser
IQA	Interquartilsabstand
MAD	Durchschnittliche Abweichung zum Median
ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamin
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NMR	Kernspinresonanz
Pyr	Pyruvat
RDR	Rückdruckregler
RID	Berechnungsindexdetektor
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
UHPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
UVD	UV-Detektor
VZV	Verweilzeitverteilung

Literatur

- [1] Andreas Liese, Karsten Seelbach und Christian Wandrey. *Industrial Biotransformations*. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. ISBN: 9783527300945.
- [2] John M. Woodley. „Accelerating the implementation of biocatalysis in industry“. *Applied microbiology and biotechnology* 103.12 (2019), S. 4733–4739. ISSN: 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-019-09796-x.
- [3] Bastien O. Burek, Ayad W. H. Dawood, Frank Hollmann, Andreas Liese und Dirk Holtmann. „Process Intensification as Game Changer in Enzyme Catalysis“. *Frontiers in Catalysis* 2 (2022). DOI: 10.3389/fctls.2022.858706.
- [4] Isabelle Chataigner und Jacques Maddaluno. „High-Pressure Synthesis: An Eco-friendly Chemistry“. In: *ACTIVATION METHODS: SONOCHEMISTRY AND HIGH PRESSURE; ED. BY JEAN-PHILLIPE GODDARD*. Hrsg. von Jean-Philippe Goddard, Max Malacria und Cyril Ollivier. CHEMISTRY SERIES. HOBOKEN: JOHN WILEY, 2020, S. 95–149. ISBN: 9781786305107. DOI: 10.1002/9781119687443.ch2.
- [5] Michael J. Eisenmenger und José I. Reyes-De-Corcuera. „High pressure enhancement of enzymes: A review“. *Enzyme and microbial technology* 45.5 (2009), S. 331–347. ISSN: 0141-0229. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.08.001.
- [6] W. C. Röntgen. „Kurze Mittheilung von Versuchen über den Einfluss des Druckes auf einige physikalische Erscheinungen“. *Annalen der Physik* 281.1 (1892), S. 98–107. ISSN: 0003-3804. DOI: 10.1002/andp.18922810109.
- [7] Peter W. Atkins und Julio de Paula. *Physikalische Chemie*. 8., [komplett überarb.] Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verl., 2006. ISBN: 9780716787594.
- [8] Charles G. Hill und Thatcher W. Root. *An introduction to chemical engineering kinetics & reactor design // Introduction to chemical engineering kinetics and reactor design*. Second edition. New York: Wiley, 1977 // 2014. ISBN: 978-1-118-36825-1.
- [9] İsmail Tosun. *The thermodynamics of phase and reaction equilibria*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. ISBN: 0444594973.
- [10] Paul A. Clarke, Nimesh Mistry und Gavin H. Thomas. „Synthesis of the complete series of mono acetates of N-acetyl-D-neuraminic acid“. *Organic & biomolecular chemistry* 10.3 (2012), S. 529–535. DOI: 10.1039/c1ob06348k.
- [11] Ajit Varki. *Essentials of glycobiology*. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. ISBN: 9780879697709.

- [12] Emmanuele Severi, Derek W. Hood und Gavin H. Thomas. „Sialic acid utilization by bacterial pathogens“. *Microbiology (Reading, England)* 153.Pt 9 (2007), S. 2817–2822. ISSN: 1350-0872. DOI: 10.1099/mic.0.2007/009480-0.
- [13] Fei Tao, Yinan Zhang, Cuiqing Ma und Ping Xu. „Biotechnological production and applications of N-acetyl-D-neuraminic acid: current state and perspectives“. *Applied microbiology and biotechnology* 87.4 (2010), S. 1281–1289. ISSN: 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-010-2700-6.
- [14] Ajit Varki. „Sialic acids in human health and disease“. *Trends in molecular medicine* 14.8 (2008), S. 351–360. ISSN: 1471-4914. DOI: 10.1016/j.molmed.2008.06.002.
- [15] W. Gielen. „Vorkommen und biologische Bedeutung der Neuraminsäure“. *Die Naturwissenschaften* 55.3 (1968), S. 104–109. ISSN: 0028-1042. DOI: 10.1007/BF00624236.
- [16] Rudolf Jäckh. „Chemie und Biologie der Sialinsäuren“. *Chemie in unserer Zeit* 10.5 (1976), S. 139–146. DOI: 10.1002/ciuz.19760100503.
- [17] Oliver M. T. Pearce und Heinz Läubli. „Sialic acids in cancer biology and immunity“. *Glycobiology* 26.2 (2016), S. 111–128. DOI: 10.1093/glycob/cwv097.
- [18] Larisa Gubareva und Teena Mohan. „Antivirals Targeting the Neuraminidase“. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 12.1 (2022). ISSN: 2157-1422. DOI: 10.1101/cshperspect.a038455.
- [19] Rahul Mishra, Xing Yu, Chandan Kishor, Gavan Holloway, Kam Lau, Mark von Itzstein, Barbara S. Coulson und Helen Blanchard. „Specificity and affinity of neuraminic acid exhibited by canine rotavirus strain K9 carbohydrate-binding domain (VP8*)“. *Journal of molecular recognition : JMR* 31.9 (2018), e2718. DOI: 10.1002/jmr.2718.
- [20] Tariq A. Altalhi, Khaled Alswat, Walaa F. Alsanie, Mohamed M. Ibrahim, Ali Aldalbahi und Hamdy S. El-Sheshtawy. „Chloroquine and hydroxychloroquine inhibitors for COVID-19 sialic acid cellular receptor: Structure, hirshfeld atomic charge analysis and solvent effect“. *Journal of molecular structure* 1228 (2021), S. 129459. ISSN: 0022-2860. DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.129459.
- [21] Alexander N. Baker u. a. „The SARS-COV-2 Spike Protein Binds Sialic Acids and Enables Rapid Detection in a Lateral Flow Point of Care Diagnostic Device“. *ACS central science* 6.11 (2020), S. 2046–2052. ISSN: 2374-7943. DOI: 10.1021/acscentsci.0c00855.
- [22] Alexander N. Baker u. a. „Glycan-Based Flow-Through Device for the Detection of SARS-COV-2“. *ACS sensors* 6.10 (2021), S. 3696–3705. ISSN: 2379-3694. DOI: 10.1021/acssensors.1c01470.
- [23] Sarah J. Luchansky, Kevin J. Yarema, Saori Takahashi und Carolyn R. Bertozzi. „GlcNAc 2-epimerase can serve a catabolic role in sialic acid metabolism“. *The Journal of biological chemistry* 278.10 (2003), S. 8035–8042. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M212127200.

- [24] Franziska Obst, Michael Mertz, Philipp J. Mehner, Anthony Beck, Kathrin Castiglione, Andreas Richter, Brigitte Voit und Dietmar Appelhans. „Enzymatic Synthesis of Sialic Acids in Microfluidics to Overcome Cross-Inhibitions and Substrate Supply Limitations“. *ACS applied materials & interfaces* 13.41 (2021), S. 49433–49444. ISSN: 1944-8244. DOI: 10.1021/acsami.1c12307.
- [25] Isafumi Maru, Jun Ohnishi, Yasuhiro Ohta und Yoji Tsukada. „Why is sialic acid attracting interest now? complete enzymatic synthesis of sialic acid with N-acylglucosamine 2-epimerase“. *Journal of bioscience and bioengineering* 93.3 (2002), S. 258–265. ISSN: 1389-1723. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80026-3.
- [26] Sheng-Chia Chen, Chi-Hung Huang, Shu-Jung Lai, Chia Shin Yang, Tzu-Hung Hsiao, Ching-Heng Lin, Pin-Kuei Fu, Tzu-Ping Ko und Yeh Chen. „Mechanism and inhibition of human UDP-GlcNAc 2-epimerase, the key enzyme in sialic acid biosynthesis“. *Scientific reports* 6.1 (2016), S. 23274. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep23274.
- [27] Xiaolong Zhang, Yanfeng Liu, Long Liu, Jianghua Li, Guocheng Du und Jian Chen. „Microbial production of sialic acid and sialylated human milk oligosaccharides: Advances and perspectives“. *Biotechnology advances* 37.5 (2019), S. 787–800. ISSN: 0734-9750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.04.011.
- [28] Hye Seon Heo, MinJi An, Ji Sun Lee, Hee Kyong Kim und Yeong-Chul Park. „Repeated dose 90-day oral toxicity test of G-7% NANA in rats: An application of new criterion for toxicity determination to test article-induced changes“. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 95 (2018), S. 260–269. ISSN: 0273-2300. DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.03.016.
- [29] Christel Tran, Licia Turolla, Diana Ballhausen, Sandrine Cornaz Buros, Tony Teav, Hector Gallart-Ayala, Julijana Ivanisevic, Mohamed Faouzi, Dirk J. Lefeber, Ivan Ivanovski, Sara Giangioffe, Stefano Giuseppe Caraffi, Livia Garavelli und Andrea Superti-Furga. „The fate of orally administered sialic acid: First insights from patients with N-acetylneuraminic acid synthase deficiency and control subjects“. *Molecular genetics and metabolism reports* 28 (2021), S. 100777. ISSN: 2214-4269. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2021.100777.
- [30] Weiwei Zhu, Xiangsong Chen, Lixia Yuan, Jinyong Wu und Jianming Yao. „Degradation Kinetics and Shelf Life of N-acetylneuraminic Acid at Different pH Values“. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25.21 (2020). ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules25215141.
- [31] Junbo Zhou, Xianzhong Chen, Liping Lu, Algasan Govender, Haiquan Yang und Wei Shen. „Enhanced production of N -acetyl- d -neuraminic acid by whole-cell bio-catalysis of Escherichia coli“. *Journal of molecular catalysis. B, Enzymatic* 125 (2016), S. 42–48. ISSN: 1381-1177. DOI: 10.1016/j.molcatb.2015.11.027.

- [32] Deqiang Zhu, Xiaobei Zhan, Jianrong Wu, Minjie Gao und Zhongsheng Zhao. „Efficient whole-cell biocatalyst for Neu5Ac production by manipulating synthetic, degradation and transmembrane pathways“. *Biotechnology letters* 39.1 (2017), S. 55–63. DOI: 10.1007/s10529-016-2215-z.
- [33] Bai-Xue Lin, Zi-Juan Zhang, Wei-Feng Liu, Zhi-Yang Dong und Yong Tao. „Enhanced production of N-acetyl-D-neuraminic acid by multi-approach whole-cell biocatalyst“. *Applied microbiology and biotechnology* 97.11 (2013), S. 4775–4784. ISSN: 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-013-4754-8.
- [34] Qingxiao Pang, Hao Han, Ya Xu, Xiaoqin Liu, Qingsheng Qi und Qian Wang. „Exploring Amino Sugar and Phosphoenolpyruvate Metabolism to Improve Escherichia coli N-Acetylneuraminic Acid Production“. *Journal of agricultural and food chemistry* 68.42 (2020), S. 11758–11764. ISSN: 0021-8561. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c04725.
- [35] „FERMENTATIVE PRODUCTION OF N-ACETYLNEURAMINIC ACID - European Patent Office - EP 3473644 A1“. Pat. 2019.
- [36] Eric Samain. „HIGH YIELD PRODUCTION OF SIALIC ACID (NEU5AC) BY FERMENTATION - European Patent Office - EP 2076601 B1“. Pat. 2011.
- [37] Massimo Merighi, Matthew Ian Heidtman und John M. McCoy. „MICROORGANISMS AND METHODS FOR PRODUCING SIALYLATED AND N-ACETYLGLUCOSAMINE - CONTAINING OLIGOSACCHARIDES“. Pat. US 10 , 415 , 069 B2. 2018.
- [38] Xiaoman Xu, Chao Gao, Xifeng Zhang, Bin Che, Cuiqing Ma, Jianhua Qiu, Fei Tao und Ping Xu. „Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by use of an efficient spore surface display system“. *Applied and Environmental Microbiology* 77.10 (2011), S. 3197–3201. ISSN: 1098-5336. DOI: 10.1128/AEM.00151-11.
- [39] Donald G. Comb und Saul Roseman. „The Sialic Acids“. *The Journal of biological chemistry* 235.9 (1960), S. 2529–2537. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)76908-7.
- [40] Marie José Haglund Halsør, Ulli Rothweiler, Bjørn Altermark und Inger Lin Uttakleiv Raeder. „The crystal structure of the N-acetylglucosamine 2-epimerase from Nostoc sp. KVJ10 reveals the true dimer“. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology* 75.Pt 1 (2019), S. 90–100. ISSN: 2059-7983. DOI: 10.1107/S2059798318017047.
- [41] Udo Kragl. *Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen enzymatischen Synthese von N-Acetylneuraminsäure*. Berichte des Forschungszentrums Jülich Forschungszentrum Jülich. Jülich: Forschungszentrum, Zentralbibliothek, 1992.

- [42] Vera Zimmermann, Hans-Georg Hennemann, Thomas Dausmann und Udo Kragl. „Modelling the reaction course of N-acetylneuraminic acid synthesis from N-acetyl-D-glucosamine—new strategies for the optimisation of neuraminic acid synthesis“. *Applied microbiology and biotechnology* 76.3 (2007), S. 597–605. ISSN: 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-007-1033-6.
- [43] Anna Groher und Kathrin Hoelsch. „Mechanistic model for the synthesis of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminic acid lyase from *Escherichia coli* K12“. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 83 (2012), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.molcatb.2012.05.016.
- [44] Wenyan Ji, Wujin Sun, Jinmei Feng, Tianshun Song, Dalu Zhang, Pingkai Ouyang, Zhen Gu und Jingjing Xie. „Characterization of a novel N-acetylneuraminic acid lyase favoring industrial N-acetylneuraminic acid synthesis“. *Scientific reports* 5 (2015), S. 9341. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep09341.
- [45] Chao-Hung Kao, Yih-Yuan Chen, Lian-Ren Wang und Yen-Chung Lee. „Production of N-acetyl-D-neuraminic Acid by Recombinant Single Whole Cells Co-expressing N-acetyl-D-glucosamine-2-epimerase and N-acetyl-D-neuraminic Acid Aldolase“. *Molecular biotechnology* 60.6 (2018), S. 427–434. ISSN: 1073-6085. DOI: 10.1007/s12033-018-0085-4.
- [46] Shiyuan Hu, Jun Chen, Zhongyi Yang, Lijun Shao, Hua Bai, Jiali Luo, Weihong Jiang und Yunliu Yang. „Coupled bioconversion for preparation of N-acetyl-D-neuraminic acid using immobilized N-acetyl-D-glucosamine-2-epimerase and N-acetyl-D-neuraminic acid lyase“. *Applied microbiology and biotechnology* 85.5 (2010), S. 1383–1391. ISSN: 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-009-2163-9.
- [47] David O. Hooks, Paul A. Blatchford und Bernd H. A. Rehm. „Bioengineering of bacterial polymer inclusions catalyzing the synthesis of N-acetylneuraminic acid“. *Applied and Environmental Microbiology* 79.9 (2013), S. 3116–3121. ISSN: 1098-5336. DOI: 10.1128/AEM.03947-12.
- [48] Victor R. L. J. Bloemendal, Sam J. Moons, Jurriaan J. A. Heming, Mohamed Chayoua, Olaf Niesink, Jan C. M. van Hest, Thomas J. Boltje und Floris P. J. T. Rutjes. „Chemoenzymatic Synthesis of Sialic Acid Derivatives Using Immobilized N-Acetylneuraminic Acid Lyase in a Continuous Flow Reactor“. *Advanced synthesis & catalysis* 361.11 (2019), S. 2443–2447. ISSN: 1615-4150. DOI: 10.1002/adsc.201900146.
- [49] Ludwig Klermund, Anna Groher und Kathrin Castiglione. „New N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerases from cyanobacteria with high activity in the absence of ATP and low inhibition by pyruvate“. *Journal of biotechnology* 168.3 (2013), S. 256–263. ISSN: 0168-1656. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.003.
- [50] Ludwig Klermund, Amelie Riederer, Annique Hunger und Kathrin Castiglione. „Protein engineering of a bacterial N-acetyl-d-glucosamine 2-epimerase for improved stability under process conditions“. *Enzyme and microbial technology* 87-88 (2016), S. 70–78. ISSN: 0141-0229. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.04.006.

- [51] Muhammad Iftikhar Hussain, Xiaolong Zhang, Xueqin Lv, Samra Basharat, Umar Shahbaz, Jianghua Li, Guocheng Du, Long Liu und Yanfeng Liu. „Enzymatic production of N-acetylneuraminic acid: advances and perspectives“. *Systems Microbiology and Biomanufacturing* 2.1 (2022), S. 130–146. ISSN: 2662-7655. DOI: 10.1007/s43393-021-00050-y.
- [52] Selin Kara. *Online monitoring of biocatalytic 2-Hydroxy ketone synthesis under ambient and high pressure*. Berlin: Mensch-und-Buch-Verl., 2012. ISBN: 9783863871048 3863871049.
- [53] Sabine Schelch, Manuel Eibinger, Stefanie Gross Belduma, Barbara Petschacher, Jürgen Kuballa und Bernd Nidetzky. „Engineering analysis of multienzyme cascade reactions for 3'-sialyllactose synthesis“. *Biotechnology and bioengineering* 118.11 (2021), S. 4290–4304. DOI: 10.1002/bit.27898.
- [54] Rohana Abu und John M. Woodley. „Application of Enzyme Coupling Reactions to Shift Thermodynamically Limited Biocatalytic Reactions“. *ChemCatChem* 7.19 (2015), S. 3094–3105. ISSN: 1867-3880. DOI: 10.1002/cctc.201500603.
- [55] Jianyong Yi, Bin Jiang, Zhong Zhang, Xiaojun Liao, Yan Zhang und Xiaosong Hu. „Effect of ultrahigh hydrostatic pressure on the activity and structure of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase“. *Journal of agricultural and food chemistry* 60.2 (2012), S. 593–599. ISSN: 0021-8561. DOI: 10.1021/jf203405u.
- [56] Yongsheng Dong, Lei Ma und Yuanliang Duan. „The effect of high pressure on the intracellular trehalose synthase activity of *Thermus aquaticus*“. *World journal of microbiology & biotechnology* 32.1 (2016), S. 11. ISSN: 0959-3993. DOI: 10.1007/s11274-015-1958-3.
- [57] P. Sreedevi, P. Srinivasa Rao und P. Lalitha Kameswari. „Effect of High Pressure Processing on Enzyme Inactivation and Microbial Destruction of Sugarcane Juice“. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6.8 (2017), S. 2000–2006. ISSN: 23197692. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.609.245.
- [58] Irene Albertos, Daniel Rico und Ana B. Martin-Diana. „Improving the texture of healthy apple snacks by combining processing and technology (high pressure and vacuum frying)“. *Journal of food processing and preservation* 44.3 (2020). ISSN: 0145-8892. DOI: 10.1111/jfpp.14352.
- [59] Nagwa Ali, Vladimir Popović, Tatiana Koutchma, Keith Warriner und Yan Zhu. „Effect of thermal, high hydrostatic pressure, and ultraviolet-C processing on the microbial inactivation, vitamins, chlorophyll, antioxidants, enzyme activity, and color of wheatgrass juice“. *Journal of Food Process Engineering* 43.1 (2020). DOI: 10.1111/jfpe.13036.
- [60] Vinicio Serment-Moreno, Gustavo Barbosa-Cánovas, José Antonio Torres und Jorge Welti-Chanes. „High-pressure Processing: Kinetic Models for Microbial and Enzyme Inactivation“. *Food Engineering Reviews* 6.3 (2014), S. 56–88. DOI: 10.1007/s12393-014-9075-x.

- [61] Adrián Lomelí-Martín, Luz María Martínez, Jorge Welti-Chanes und Zamantha Escobedo-Avellaneda. „Induced Changes in Aroma Compounds of Foods Treated with High Hydrostatic Pressure: A Review“. *Foods (Basel, Switzerland)* 10.4 (2021). ISSN: 2304-8158. DOI: 10.3390/foods10040878.
- [62] Gezai Abera. „Review on high-pressure processing of foods“. *Cogent food & agriculture* 5.1 (2019), S. 1568725. ISSN: 2331-1932. DOI: 10.1080/23311932.2019.1568725.
- [63] Yu-Ting Chen, Yi-An Chen, Chieh-Hsiu Lee, Jung-Tsung Wu, Kuan-Chen Cheng und Chang-Wei Hsieh. „A strategy for promoting γ -glutamyltransferase activity and enzymatic synthesis of S-allyl-(L)-cysteine in aged garlic via high hydrostatic pressure pretreatments“. *Food chemistry* 316 (2020), S. 126347. ISSN: 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126347.
- [64] Zhang Huijuan, Pan Jian, Liang Juan und Xia Xiaoxiao. „High-pressure effects on the mechanism of accumulated inosine 5'-monophosphate“. *Innovative food science & emerging technologies : IFSET : the official scientific journal of the European Federation of Food Science and Technology* 45 (2018), S. 330–334. ISSN: 1466-8564. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.12.005.
- [65] Henry. Eyring. „The Activated Complex and the Absolute Rate of Chemical Reactions“. *Chemical Reviews* 17.1 (1935), S. 65–77. ISSN: 0009-2665. DOI: 10.1021/cr60056a006.
- [66] Henry Eyring und John L. Magee. „Application of the theory of absolute reaction rates to bacterial luminescence“. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 20.2 (1942), S. 169–177. ISSN: 0095-9898. DOI: 10.1002/jcp.1030200205.
- [67] Hani Shkolnikov, Valeria Belochvostov, Zoya Okun und Avi Shpigelman. „The effect of pressure on the kinetics of polyphenolics degradation – Implications to hyperbaric storage using Epigallocatechin-gallate as a model“. *Innovative food science & emerging technologies : IFSET : the official scientific journal of the European Federation of Food Science and Technology* 59 (2020), S. 102273. ISSN: 1466-8564. DOI: 10.1016/j.ifset.2019.102273.
- [68] Claus Czeslik, Trung Quan Luong und Roland Winter. „Enzymatic activity under pressure“. *MRS Bulletin* 42.10 (2017), S. 738–742. DOI: 10.1557/mrs.2017.211.
- [69] Vitor Schuabb und Claus Czeslik. „Activation volumes of enzymes adsorbed on silica particles“. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 30.51 (2014), S. 15496–15503. DOI: 10.1021/la503605x.
- [70] Daniel L. Purich. „Factors Influencing Enzyme Activity“. In: *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*. Elsevier, 2010, S. 379–484. ISBN: 9780123809247. DOI: 10.1016/B978-0-12-380924-7.10007-9.
- [71] Ryo Kitahara, Katsuaki Oyama, Takahiro Kawamura, Keita Mitsuhashi, Soichiro Kitazawa, Kazuhiro Yasunaga, Natsuno Sagara, Megumi Fujimoto und Kazuki Terauchi. „Pressure accelerates the circadian clock of cyanobacteria“. *Scientific reports* 9.1 (2019), S. 12395. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-019-48693-1.

- [72] P. Butz, K. O. Greulich und H. Ludwig. „Volume changes during enzyme reactions: indications of enzyme pulsation during fumarase catalysis“. *Biochemistry* 27.5 (1988), S. 1556–1563. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi00405a024.
- [73] Helder Vila-Real, António J. Alfaia, Robert S. Phillips, António R. Calado und Maria H.L. Ribeiro. „Pressure-enhanced activity and stability of α -l-rhamnosidase and α -d-glucosidase activities expressed by naringinase“. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 65.1-4 (2010), S. 102–109. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.01.022.
- [74] Kohsuke Adachi, Kento Tanimura, Toshiyuki Mitsui, Takami Morita, Ikuko Yoshio, Kou Ikejima und Katsuji Morioka. „Cellulolytic activity in the hepatopancreas of *Chionoecetes opilio* and *Chionoecetes japonicus*: enzymatic adaptations to deep sea environment“. *Fisheries science : FS* 82.5 (2016), S. 835–841. ISSN: 0919-9268. DOI: 10.1007/s12562-016-1014-8.
- [75] John T. Penniston. „High hydrostatic pressure and enzymic activity: Inhibition of multimeric enzymes by dissociation“. *Archives of biochemistry and biophysics* 142.1 (1971), S. 322–332. ISSN: 0003-9861. DOI: 10.1016/0003-9861(71)90290-6.
- [76] Max Planck. „Ueber das Princip der Vermehrung der Entropie: Gesetze des Eintritts beliebiger thermodynamischer und chemischer Reactionen“. *Annalen der Physik und Chemie* 268.11 (1887), S. 462–503. ISSN: 00033804. DOI: 10.1002/andp.18872681108.
- [77] M. E. Bruins, A.E.M. Janssen und R. M. Boom. „Equilibrium shifts in enzyme reactions at high pressure“. *Journal of molecular catalysis. B, Enzymatic* 39.1-4 (2006), S. 124–127. ISSN: 1381-1177. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.01.033.
- [78] Patrick Masson und Claude Balny. „Linear and non-linear pressure dependence of enzyme catalytic parameters“. *Biochimica et biophysica acta* 1724.3 (2005), S. 440–450. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.05.003.
- [79] Eiji Ohmae, Yurina Miyashita und Chiaki Kato. „Thermodynamic and functional characteristics of deep-sea enzymes revealed by pressure effects“. *Extremophiles : life under extreme conditions* 17.5 (2013), S. 701–709. DOI: 10.1007/s00792-013-0556-2.
- [80] B. Andersen und P. E. Broe. „Effects of high pressure upon the kinetic constants of the enzyme fumarase“. *Acta chemica Scandinavica* 26.9 (1972), S. 3691–3698. ISSN: 0001-5393. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.26-3691.
- [81] John McCoy und Wayne L. Hubbell. „High-pressure EPR reveals conformational equilibria and volumetric properties of spin-labeled proteins“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.4 (2011), S. 1331–1336. DOI: 10.1073/pnas.1017877108.
- [82] William J. Le Noble und Hartwig Kelm. „Chemie in komprimierten Lösungen“. *Angewandte Chemie* 92.11 (1980), S. 887–904. ISSN: 00448249. DOI: 10.1002/ange.19800921105.

- [83] Hiroaki Hata, Masayoshi Nishiyama und Akio Kitao. „Molecular dynamics simulation of proteins under high pressure: Structure, function and thermodynamics“. *Biochimica et biophysica acta. General subjects* 1864.2 (2020). DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.07.004.
- [84] Marcus D. Collins, Gerhard Hummer, Michael L. Quillin, Brian W. Matthews und Sol M. Gruner. „Cooperative water filling of a nonpolar protein cavity observed by high-pressure crystallography and simulation“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.46 (2005), S. 16668–16671. DOI: 10.1073/pnas.0508224102.
- [85] Qi Huang, Jocelyn M. Rodgers, Russell J. Hemley und Toshiko Ichiye. „Adaptations for pressure and temperature effects on loop motion in Escherichia coli and Moritella profunda dihydrofolate reductase“. *High Pressure Research* 39.2 (2019), S. 225–237. DOI: 10.1080/08957959.2019.1584799.
- [86] Helder Vila-Real, António J. Alfaia, António R. Calado, Robert S. Phillips und Maria H.L. Ribeiro. „High pressure: a tool to improve the enzymatic production of glycosides“. *High Pressure Research* 31.3 (2011), S. 475–487. DOI: 10.1080/08957959.2011.596538.
- [87] Kazuyuki Akasaka und Akihiro Maeno. „Proteins in Wonderland: The Magical World of Pressure“. *Biology* 11.1 (2021). ISSN: 2079-7737. DOI: 10.3390/biology11010006.
- [88] Sunao Mori, Atsuko Yokoyama, Reiko Iguchi, Shuhei Yamamoto, Atsushi Suzuki, Wataru Mizunoya, Ryuichi Tatsumi, Keiko Yoshioka und Yoshihide Ikeuchi. „EFFECT OF HIGH PRESSURE TREATMENT ON CYTOPLASMIC 5'-NUCLEOTIDASE FROM RABBIT SKELETAL MUSCLE“. *Journal of food biochemistry* 31.3 (2007), S. 314–327. ISSN: 0145-8884. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2007.00117.x.
- [89] Eylül Ozturk, Mecit H. Oztop und Hami Alpas. „Use of high hydrostatic pressure (HHP) for increasing the product yield of lignocellulosic biomass hydrolysis: A study for peanut hull and microcrystalline cellulose“. *Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e. und] Technologie. Food science + technology. Science + technologie alimentaire* 147 (2021), S. 111556. ISSN: 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111556.
- [90] Hans-Joachim Kretzschmar und Wolfgang Wagner. „D2.1 Thermophysikalische Stoffwerte von Wasser“. In: *VDI-Wärmeatlas: Fachlicher Träger VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen*. Hrsg. von Peter Stephan, Stephan Kabelac, Matthias Kind, Dieter Mewes, Karlheinz Schaber und Thomas Wetzel. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019, S. 201–218. ISBN: 978-3-662-52989-8. DOI: 10.1007/978-3-662-52989-8.
- [91] D. G. Fried und R. B. Dooley. *Revised Release on the IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Properties of Ordinary Water Substance for General and*

Scientific Use. Hrsg. von International Association for the Properties of Water and Steam. Doorwerth, The Netherlands, 2009. (Besucht am 31. 10. 2021).

- [92] Bjørn Andersen, Finn Grønlund, Arne Kjekshus, Arne F. Andresen, Eberhard Hoyer, V. P. Spiridonov und T. G. Strand. „High Pressure Kinetics of Glucose Mutarotation Studied by Optical Rotation“. *Acta chemica Scandinavica (Copenhagen, Denmark : 1989)* 33a (1979), S. 275–280. ISSN: 0904-213X. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.33a-0275.
- [93] Sonia Diab, Ludovik Noël-Duchesneau, Morgane Sanselme, Yoshinori Kondo, Michael de Paolis und Isabelle Chataigner. „High Pressure Elicits Unexpected Transformations of Plain Nitroaromatics with 4-(Cyclohex-1-en-1-yl)morpholine“. *European journal of organic chemistry* 2018.18 (2018), S. 2048–2052. ISSN: 1434-193X. DOI: 10.1002/ejoc.201800316.
- [94] Claude Balny, Jean Louis Saldana und Noël Dahan. „High-pressure stopped-flow spectrometry at low temperatures“. *Analytical biochemistry* 139.1 (1984), S. 178–189. ISSN: 0003-2697. DOI: 10.1016/0003-2697(84)90403-2.
- [95] Trung Quan Luong und Roland Winter. „Combined pressure and cosolvent effects on enzyme activity - a high-pressure stopped-flow kinetic study on -chymotrypsin“. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 17.35 (2015), S. 23273–23278. DOI: 10.1039/c5cp03529e.
- [96] Thierry Prangé, Philippe Carpentier, Anne Claire Dhaussy, Peter van der Linden, Eric Girard und Nathalie Colloc'h. „Comparative study of the effects of high hydrostatic pressure per se and high argon pressure on urate oxidase ligand stabilization“. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology* 78.Pt 2 (2022), S. 162–173. ISSN: 2059-7983. DOI: 10.1107/S2059798321012134.
- [97] Martina Schedler, Robert Hiessl, Ana Gabriela Valladares Juárez, Giselher Gust und Rudolf Müller. „Effect of high pressure on hydrocarbon-degrading bacteria“. *AMB Express* 4 (2014), S. 77. ISSN: 2191-0855. DOI: 10.1186/s13568-014-0077-0.
- [98] Steffen Hackbusch, Nuttapol Noirungsee, Juan Viamonte, Xiaoxu Sun, Paul Bubenheim, Joel E. Kostka, Rudolf Müller und Andreas Liese. „Influence of pressure and dispersant on oil biodegradation by a newly isolated Rhodococcus strain from deep-sea sediments of the gulf of Mexico“. *Marine pollution bulletin* 150 (2020), S. 110683. ISSN: 0025-326X. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.110683.
- [99] Marco Berheide, Stephanie Peper, Selin Kara, Wei Sing Long, Steffen Schenkel, Martina Pohl, Bernd Niemeyer und Andreas Liese. „Influence of the hydrostatic pressure and pH on the asymmetric 2-hydroxyketone formation catalyzed by *Pseudomonas putida* benzoylformate decarboxylase and variants thereof“. *Biotechnology and bioengineering* 106.1 (2010), S. 18–26. DOI: 10.1002/bit.22650.
- [100] Matthew B. Plutschack, Bartholomäus Pieber, Kerry Gilmore und Peter H. Seiberger. „The Hitchhiker’s Guide to Flow Chemistry II“. *Chemical Reviews* 117.18 (2017), S. 11796–11893. ISSN: 0009-2665. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00183.

- [101] Emiko Koyama, Noriko Ito, Jun-ichi Sugiyama, Joshua P. Barham, Yasuo Norikane, Reiko Azumi, Noriyuki Ohneda, Yoshinobu Ohno, Takeo Yoshimura, Hiromichi Odajima und Tadashi Okamoto. „A continuous-flow resonator-type microwave reactor for high-efficiency organic synthesis and Claisen rearrangement as a model reaction“. *Journal of flow chemistry* 8.3-4 (2018), S. 147–156. ISSN: 2062-249X. DOI: 10.1007/s41981-018-0021-6.
- [102] Sándor B. Ötvös, Adám Georgiádes, István M. Mándity, Lóránd Kiss und Ferenc Fülöp. „Efficient continuous-flow synthesis of novel 1,2,3-triazole-substituted -aminocyclohexanecarboxylic acid derivatives with gram-scale production“. *Beilstein journal of organic chemistry* 9 (2013), S. 1508–1516. ISSN: 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.9.172.
- [103] Andreas Kirschning. „Chemistry in flow systems“. *Beilstein journal of organic chemistry* 5 (2009), S. 15. ISSN: 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.5.15.
- [104] Andreas Kirschning. „Chemistry in flow systems II“. *Beilstein journal of organic chemistry* 7 (2011), S. 1046–1047. ISSN: 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.7.119.
- [105] Andreas Kirschning. „Chemistry in flow systems III“. *Beilstein journal of organic chemistry* 9 (2013), S. 1696–1697. ISSN: 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.9.193.
- [106] Guido Gambacorta, James S. Sharley und Ian R. Baxendale. „A comprehensive review of flow chemistry techniques tailored to the flavours and fragrances industries“. *Beilstein journal of organic chemistry* 17 (2021), S. 1181–1312. ISSN: 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.17.90.
- [107] Martin Elliott und Harris Makatsoris. „Beyond the flow reactor, manufacturing in the 21st Century: A business perspective“. *Chimica Oggi - Chemistry Today* 38.3 (2020), S. 8–9.
- [108] Shijie Liu. „Enzymes“. In: *Bioprocess engineering*. Hrsg. von Shijie Liu. Amsterdam, Boston und Heidelberg: Elsevier, 2017, S. 297–373. ISBN: 9780444637833. DOI: 10.1016/B978-0-444-63783-3.00007-1.
- [109] Rowan Lindeque und John Woodley. „Reactor Selection for Effective Continuous Biocatalytic Production of Pharmaceuticals“. *Catalysts (Basel, Switzerland)* 9.3 (2019), S. 262. ISSN: 2073-4344. DOI: 10.3390/catal9030262.
- [110] Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz, Hrsg. *Bioprozesstechnik*. 4. Auflage. Berlin und Heidelberg: Springer Spektrum, 2018. ISBN: 978-3-662-54041-1. DOI: 10.1007/978-3-662-54042-8.
- [111] Niclas Büscher. „Additiv gefertigte Strukturen als Enzymträger und Strömungsführer für Biokatalysen im Strömungsrohr“. Diss. TUHH Universitätsbibliothek, 2020. DOI: 10.15480/882.3035.
- [112] Jannis A. Reich, Miriam Aßmann, Kristin Hölting, Paul Bubenheim, Jürgen Kuballa und Andreas Liese. „Shift of the reaction equilibrium at high pressure in the continuous synthesis of neuraminic acid“. *Beilstein journal of organic chemistry* 18 (2022), S. 567–579. ISSN: 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.18.59.

- [113] L. Michaelis und Maud L. Menten. „Die Kinetik der Invertinwirkung“. *Biochem. Zeitung* 49 (1913), S. 333.
- [114] Andrés Illanes. *Enzyme Biocatalysis: Principles and applications*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. ISBN: 978-1-4020-8360-0. DOI: 10.1007/978-1-4020-8361-7.
- [115] Hans Bisswanger und Dmitrij Degtjarev. *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*. 3., völlig neu bearb. Aufl. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience und Wiley-VCH, 2000. ISBN: 9783527300969. DOI: 10.1002/3527603298.
- [116] Horst Chmiel. *Bioprozesstechnik*. 3., neu bearb. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl., 2011. ISBN: 978-3-8274-2476-1. DOI: 10.1007/978-3-8274-2477-8.
- [117] Athel Cornish-Bowden. „One hundred years of Michaelis–Menten kinetics“. *Perspectives in science* 4 (2015), S. 3–9. ISSN: 2213-0209. DOI: 10.1016/j.pisc.2014.12.002.
- [118] Kathrin Castiglione. „Enzymkinetik“. In: *Bioprozesstechnik*. Hrsg. von Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz. Berlin und Heidelberg: Springer Spektrum, 2018, S. 1–44. ISBN: 978-3-662-54041-1. DOI: 10.1007/978-3-662-54042-8{\textunderscore}1.
- [119] G. E. Briggs und J. B. Haldane. „A Note on the Kinetics of Enzyme Action“. *The Biochemical journal* 19.2 (1925), S. 338–339. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/bj0190338.
- [120] K. Miyanaga und H. Unno. „Reaction Kinetics and Stoichiometry“. In: *Comprehensive biotechnology*. Hrsg. von Murray Moo-Young. Amsterdam: Elsevier, 2011, S. 33–46. ISBN: 9780080885049. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00085-4.
- [121] Dieter Jahn. *Enzyme Database - BRENDA*. Hrsg. von Institute for Biochemistry and Biotechnology. 2021-02-06. URL: <https://www.brenda-enzymes.org/> (besucht am 06.02.2021).
- [122] Kenneth A. Johnson. „New standards for collecting and fitting steady state kinetic data“. *Beilstein journal of organic chemistry* 15 (2019), S. 16–29. ISSN: 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.15.2.
- [123] Jürgen Pleiss. „Thermodynamic Activity-Based Progress Curve Analysis in Enzyme Kinetics“. *Trends in biotechnology* 36.3 (2018), S. 234–238. ISSN: 0167-7799. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.10.004.
- [124] Anton Wangler, Dominik Böttcher, Aline Hüser, Gabriele Sadowski und Christoph Held. „Prediction and Experimental Validation of Co-Solvent Influence on Michaelis Constants: A Thermodynamic Activity-Based Approach“. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 24.61 (2018), S. 16418–16425. DOI: 10.1002/chem.201803573.

- [125] Su-Yan Wang, Pedro Laborda, Ai-Min Lu, Xu-Chu Duan, Hong-Yu Ma, Li Liu und Josef Voglmeir. „N-acetylglucosamine 2-Epimerase from *Pedobacter heparinus*: First Experimental Evidence of a Deprotonation/Reprotonation Mechanism“. *Catalysts (Basel, Switzerland)* 6.12 (2016), S. 212. ISSN: 2073-4344. DOI: 10.3390/catal6120212.
- [126] Wolfgang Baumann, Jürgen Freidenreich, Gerhard Weisshaar, Reinhard Brossmer und Horst Friebolin. „Spaltung und Synthese von Sialinsäuren mit Aldolase. 1 H-NMR-Untersuchungen zur Stereochemie, zur Kinetik und zum Mechanismus“. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 370.1 (1989), S. 141–150. ISSN: 0177-3593. DOI: 10.1515/bchm3.1989.370.1.141.
- [127] Adam D. Daniels, Ivan Campeotto, Marc W. van der Kamp, Amanda H. Bolt, Chi H. Trinh, Simon E. V. Phillips, Arwen R. Pearson, Adam Nelson, Adrian J. Mulholland und Alan Berry. „Reaction mechanism of N-acetylneuraminic acid lyase revealed by a combination of crystallography, QM/MM simulation, and mutagenesis“. *ACS chemical biology* 9.4 (2014), S. 1025–1032. ISSN: 1554-8929. DOI: 10.1021/cb500067z.
- [128] W.W Cleland. „The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects* 67 (1963), S. 104–137. ISSN: 09266569. DOI: 10.1016/0926-6569(63)90211-6.
- [129] Heinrich Schubert. *Handbuch der Mechanischen Verfahrenstechnik: Partikeleigenschaften, Mikroprozesse, Makroprozesse, Schüttgut*. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. ISBN: 9783527305773. DOI: 10.1002/3527603352.
- [130] Pauline M. Doran. *Bioprocess engineering principles*. 2nd ed. Waltham, MA: Academic Press, 2013. ISBN: 0080917704.
- [131] Octave Levenspiel. *The chemical reactor omnibook*. Corvallis, Or.: OSU Book Stores Inc, 1993. ISBN: 0-88246-160-5.
- [132] Barbara Schmiege, Mai Nguyen und Matthias Franzreb. „Simulative Minimization of Mass Transfer Limitations Within Hydrogel-Based 3D-Printed Enzyme Carriers“. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8 (2020), S. 365. ISSN: 2296-4185. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00365.
- [133] Dagny A. Ullmann, Mallory L. Hinks, Adrian Maclean, Christopher Butenhoff, James Grayson, Kelley Barsanti, Jose L. Jimenez, Sergey A. Nizkorodov, Saeid Kamal und Allan K. Bertram. *Viscosities, diffusion coefficients, and mixing times of intrinsic fluorescent organic molecules in brown limonene secondary organic aerosol and tests of the Stokes-Einstein equation*. 2018. DOI: 10.5194/acp-2018-899.
- [134] Kenneth George Denbigh. *The principles of chemical equilibrium: With applications in chemistry and chemical engineering*. 4. ed. Cambridge usw.: Univ. Press, 1981. ISBN: 9780521236829. DOI: 10.1017/CB09781139167604.

- [135] Ernst Schmidt, Karl Stephan und Franz Mayinger. *Technische Thermodynamik: Grundlagen und Anwendungen*. 11., neubearb. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1977. ISBN: 3-540-07978-5.
- [136] Andreas Bück und Karl-Ernst Wirth. „L1.6 Druckverlust in durchströmten Schüttungen“. In: *VDI-Wärmeatlas: Fachlicher Träger VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen*. Hrsg. von Peter Stephan, Stephan Kabelac, Matthias Kind, Dieter Mewes, Karlheinz Schaber und Thomas Wetzel. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019, S. 1425–1430. ISBN: 978-3-662-52989-8. DOI: 10.1007/978-3-662-52989-8.
- [137] Soroush Ahmadi und Farhang Sefidvash. „Study of Pressure Drop in Fixed Bed Reactor Using a Computational Fluid Dynamics (CFD) Code“. *ChemEngineering* 2.2 (2018), S. 14. DOI: 10.3390/chemengineering2020014.
- [138] Anthony G. Dixon und Michiel Nijemeisland. „CFD as a Design Tool for Fixed-Bed Reactors“. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 40.23 (2001), S. 5246–5254. ISSN: 0888-5885. DOI: 10.1021/ie001035a.
- [139] H. J. Reyneke und Charl Du Toit. „Modelling the superficial velocity distribution inside an annular packed bed“. *7th South African Conference on Computational and Applied Mechanics, SACAM 2010* (2010), S. 185–194.
- [140] Shuke Wu, Radka Snajdrova, Jeffrey C. Moore, Kai Baldenius und Uwe T. Bornscheuer. „Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications“. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 60.1 (2021), S. 88–119. ISSN: 1433-7851. DOI: 10.1002/anie.202006648.
- [141] Matthias Feigel und Olaf Hinrichsen. „Modeling of Process Operation Principles for the Immobilized Enzyme Candida Antarctica under Activity Decay“. *Chemieingenieur-technik* 94.5 (2022), S. 652–662. ISSN: 0009-286X. DOI: 10.1002/cite.202100187.
- [142] Il’ja N. Bronstejn und Konstantin A. Semendjaev. *Taschenbuch der Mathematik*. 25., durchges. Aufl. Stuttgart: Teubner, 1991. ISBN: 3-8154-2000-8.
- [143] Herbert Oertel. *Prandtl - Führer durch die Strömungslehre*. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, 2017. ISBN: 978-3-658-08626-8. DOI: 10.1007/978-3-658-08627-5.
- [144] Helmut Herrmann und Herbert Bucksch, Hrsg. *Wörterbuch GeoTechnik: Dictionary geotechnical engineering ; Deutsch - Englisch/German - English*. 2. Aufl. Berlin: Springer, 2013. ISBN: 978-3-642-33334-7. DOI: 10.1007/978-3-642-33335-4.
- [145] Peter Zehner. „Wärmeübertragung im durchströmten Kreisrohr – Erzwungene laminare Strömung“. *Chemie-ingenieur-technik* 93.4 (2021), S. 693–705. ISSN: 0009-286X. DOI: 10.1002/cite.202000181.

- [146] Frank V. Sander. „THE EFFECTS OF HIGH PRESSURE ON THE INVERSION OF SUCROSE AND THE MUTAROTATION OF GLUCOSE“. *The Journal of biological chemistry* 148.2 (1943), S. 311–319. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)72287-4.
- [147] Trung Quan Luong, Nelli Erwin, Matthias Neumann, Andreas Schmidt, Cornelia Loos, Volker Schmidt, Marcus Fändrich und Roland Winter. „Hydrostatic Pressure Increases the Catalytic Activity of Amyloid Fibril Enzymes“. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 55.40 (2016), S. 12412–12416. ISSN: 1433-7851. DOI: 10.1002/anie.201605715.
- [148] William L. Marshall und R. E. Mesmer. „Pressure-density relationships and ionization equilibria in aqueous solutions“. *Journal of solution chemistry* 13.6 (1984), S. 383–391. ISSN: 0095-9782. DOI: 10.1007/BF00644070.
- [149] Sefton D. Hamann. „The influence of pressure on ionization equilibria in aqueous solutions“. *Journal of solution chemistry* 11.1 (1982), S. 63–68. ISSN: 0095-9782. DOI: 10.1007/BF00664335.
- [150] Conrad T. Burris und Keith J. Laidler. „The influence of hydrostatic pressure on the rates of ionic reactions“. *Transactions of the Faraday Society* 51 (1955), S. 1497. DOI: 10.1039/tf9555101497.
- [151] H. S. Golinkin, W. G. Laidlaw und J. B. Hyne. „ON THE PRESSURE DEPENDENCE OF REACTION RATES“. *Canadian journal of chemistry* 44.18 (1966), S. 2193–2203. ISSN: 0008-4042. DOI: 10.1139/v66-330.
- [152] Yuki Hamajima, Takayuki Nagae, Nobuhisa Watanabe, Eiji Ohmae, Yasuyuki Kato-Yamada und Chiaki Kato. „Pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extremely piezophilic bacterium is attributed to a single amino acid substitution“. *Extremophiles : life under extreme conditions* 20.2 (2016), S. 177–186. DOI: 10.1007/s00792-016-0811-4.
- [153] Cheves. Walling und Dennis D. Tanner. „Organic Reactions under High Pressure. VIII. The Pressure-Dependence of ΔV^* and the Compressibility of Transition States“. *Journal of the American Chemical Society* 85.5 (1963), S. 612–615. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja00888a030.
- [154] Lisa Samuelsen, René Holm, Audrey Lathuile und Christian Schönbeck. „Buffer solutions in drug formulation and processing: How pKa values depend on temperature, pressure and ionic strength“. *International journal of pharmaceutics* 560 (2019), S. 357–364. ISSN: 0378-5173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.02.019.
- [155] Chaminda P. Samaranayake und Sudhir K. Sastry. „In situ measurement of pH under high pressure“. *The journal of physical chemistry. B* 114.42 (2010), S. 13326–13332. ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/jp1037602.
- [156] B. Raghuraman, G. Gustavson, O. C. Mullins und P. Rabbito. „Spectroscopic pH measurement for high temperatures, pressures and ionic strength“. *AIChE Journal* 52.9 (2006), S. 3257–3265. DOI: 10.1002/aic.10933.

- [157] R. Jason Quinlan und Gregory D. Reinhart. „Baroresistant buffer mixtures for biochemical analyses“. *Analytical biochemistry* 341.1 (2005), S. 69–76. ISSN: 0003-2697. DOI: 10.1016/j.ab.2005.03.002.
- [158] Atsushi Kobayashi, Satoko Gomikawa, Asami Oguro, Satoshi Maeda, Akira Yamazaki, Shinji Sato und Hirofumi Maekawa. „The Effect of High Hydrostatic Pressure on Acrylamide Generation in Aqueous Reaction Systems Using Asparagine and Glucose“. *Food science and technology research* 25.4 (2019), S. 587–596. ISSN: 1344-6606. DOI: 10.3136/fstr.25.587.
- [159] Rainer Feistel. „A new extended Gibbs thermodynamic potential of seawater“. *Progress in oceanography* 58.1 (2003), S. 43–114. ISSN: 0079-6611. DOI: 10.1016/S0079-6611(03)00088-0.
- [160] Rainer Feistel. „A Gibbs function for seawater thermodynamics for -6 to 80°C and salinity up to 120gkg⁻¹“. *Deep-sea research. Part I, Oceanographic research papers* 55.12 (2008), S. 1639–1671. ISSN: 0967-0637. DOI: 10.1016/j.dsr.2008.07.004.
- [161] W. Wagner und A. Pruß. „The IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Properties of Ordinary Water Substance for General and Scientific Use“. *Journal of physical and chemical reference data* 31.2 (2002), S. 387–535. ISSN: 0047-2689. DOI: 10.1063/1.1461829.
- [162] C. Barus. „Isothermals, isopiestic and isometrics relative to viscosity“. *American journal of science* s3-45.266 (1893), S. 87–96. ISSN: 0002-9599. DOI: 10.2475/ajs.s3-45.266.87.
- [163] H. van Leeuwen. „The determination of the pressure—viscosity coefficient of a lubricant through an accurate film thickness formula and accurate film thickness measurements“. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology* 223.8 (2009), S. 1143–1163. ISSN: 1350-6501. DOI: 10.1243/13506501JET504.
- [164] Sabri Ergun und A. A. Orning. „Fluid Flow through Randomly Packed Columns and Fluidized Beds“. *Industrial & Engineering Chemistry* 41.6 (1949), S. 1179–1184. ISSN: 0019-7866. DOI: 10.1021/ie50474a011.
- [165] J. Radestock und R. Jeschar. „Theoretische Untersuchung der inkompressiblen und kompressiblen Strömung durch Reaktor-Schüttungen“. *Chemie-ingenieur-technik* 43.6 (1971), S. 355–360. ISSN: 0009-286X. DOI: 10.1002/cite.330430608.
- [166] DIN Deutsches Institut für Normung e. V. *Stellventile für die Prozessregelung: Teil 1: Begriffe und allgemeine Betrachtungen*. 2005-06-01. URL: <https://www.perinorm.com/> (besucht am 28.03.2022).
- [167] Alina Plenis, Tomasz Bączek, Jarosław Szulfer und Michał Markuszewski. „New Materials Applied for the Stationary Phases in View of the Optimized HPLC and UHPLC Column Classification System Used in the Pharmaceutical Analysis“. *Advanced Materials Research* 1120-1121 (2015), S. 1404–1412. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.1120-1121.1404.

- [168] Elena Uliyanchenko, Peter J. Schoenmakers und Sjoerd van der Wal. „Fast and efficient size-based separations of polymers using ultra-high-pressure liquid chromatography“. *Journal of Chromatography A* 1218.11 (2011), S. 1509–1518. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.053.
- [169] John W. Dolan. „UHPLC Tips and Techniques“. *LC-GC North America* 28.11 (2010), S. 944–950. ISSN: 15275949.
- [170] Juan M. Bolivar, Alexander Mannsberger, Malene S. Thomsen, Günter Tekautz und Bernd Nidetzky. „Process intensification for O₂-dependent enzymatic transformations in continuous single-phase pressurized flow“. *Biotechnology and bioengineering* 116.3 (2019), S. 503–514. DOI: 10.1002/bit.26886.
- [171] Yoni Groisman und Aharon Gedanken. „Continuous Flow, Circulating Microwave System and Its Application in Nanoparticle Fabrication and Biodiesel Synthesis“. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces* 112.24 (2008), S. 8802–8808. ISSN: 1932-7447. DOI: 10.1021/jp801409t.
- [172] Xiugang Wang, Binghu Tian, Cuihua Wang und Jianhua Wu. „Mathematical modelling of residence time distribution in tubular loop reactors“. *The Canadian journal of chemical engineering* 95.6 (2017), S. 1101–1108. ISSN: 0008-4034. DOI: 10.1002/cjce.22736.
- [173] P. Senthil Kumar, K. Grace Pavithra und Mu. Naushad. „Characterization techniques for nanomaterials“. In: *Nanomaterials for solar cell applications*. Hrsg. von El Hadji Mamour Sakho, Jihuai Wu, Nandakumar Kalarikkal, Oluwatobi Samuel Oluwafemi und Sabu Thomas. Amsterdam: Elsevier, 2019, S. 97–124. ISBN: 9780128133378. DOI: 10.1016/B978-0-12-813337-8.00004-7.
- [174] M. de Beer. *Characterisation of thermal radiation in the near - wall region of a packed pebble bed*. 2014.
- [175] Karen M. Polizzi, Andreas S. Bommarius, James M. Broering und Javier F. Chaparro-Riggers. „Stability of biocatalysts“. *Current opinion in chemical biology* 11.2 (2007), S. 220–225. ISSN: 1367-5931. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.01.685.
- [176] María Inmaculada García García, Agustín Sola Carvajal, Francisco García Carmona und Álvaro Sánchez Ferrer. „Characterization of a novel N-acetylneuraminidase from *Staphylococcus carnosus* TM300 and its application to N-acetylneuraminic acid production“. *Journal of agricultural and food chemistry* 60.30 (2012), S. 7450–7456. ISSN: 0021-8561. DOI: 10.1021/jf3014102.
- [177] Peter P. Eckstein. *Angewandte Statistik mit SPSS: Praktische Einführung für Wirtschaftswissenschaftler*. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage. Lehrbuch. Wiesbaden: Springer Gabler, 2016. ISBN: 978-3-658-10917-2. DOI: 10.1007/978-3-658-10918-9.
- [178] Eddie Morild. „Pressure variation of enzymatic reaction rates: yeast and liver alcohol dehydrogenase“. *Biophysical chemistry* 6.3 (1977), S. 351–362. ISSN: 0301-4622. DOI: 10.1016/0301-4622(77)85016-3.

- [179] Tariq Mustafa, Thomas W. Moon und Peter W. Hochachka. „Effects of Pressure and Temperature on the Catalytic and Regulatory Properties of Muscle Pyruvate Kinase from an Off-Shore Benthic Fish“. *American zoologist* 11.3 (1971), S. 451–466. ISSN: 0003-1569. DOI: 10.1093/icb/11.3.451.
- [180] Sergio I. Martinez-Monteagudo und Marleny D. A. Saldaña. „Chemical Reactions in Food Systems at High Hydrostatic Pressure“. *Food Engineering Reviews* 6.4 (2014), S. 105–127. ISSN: 1866-7910. DOI: 10.1007/s12393-014-9087-6.
- [181] S. Takahashi, K. Takahashi, T. Kaneko, H. Ogasawara, S. Shindo und M. Kobayashi. „Human renin-binding protein is the enzyme N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase“. *Journal of biochemistry* 125.2 (1999), S. 348–353. ISSN: 0021-924X. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022293.
- [182] Christoph Maximilian Wolter. *Bestimmung der kinetischen Parameter für die Synthese von Neu5Ac aus GlcNAc durch GlcNAc-2-Epimerase und Neu5Ac-Lyase*. Hamburg, 2020.
- [183] Wladimir Reschetilowski, Hrsg. *Handbuch Chemische Reaktoren*. Springer Reference Naturwissenschaften. Berlin und Heidelberg: Springer Spektrum, 2020. ISBN: 978-3-662-56433-2. DOI: 10.1007/978-3-662-56434-9.
- [184] Biosynth Carbosynth. *Sialic Acid / N-Acetylneuraminic acid / 131-48-6 / Zanamivir Relenza / Carbosynth Product*. 2022. URL: [carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/\(w-productdisplay\)/371CEA349FFEBFDF80256A6B003598F9](https://carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/(w-productdisplay)/371CEA349FFEBFDF80256A6B003598F9) (besucht am 17.03.2022).
- [185] Biosynth Carbosynth. *N-Acetyl-D-glucosamine / 7512-17-6 / Biosynth Carbosynth*. 2022. URL: [carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/\(w-productdisplay\)/3D43EDED2A1F7B880256A6B003599A4](https://carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/(w-productdisplay)/3D43EDED2A1F7B880256A6B003599A4) (besucht am 17.03.2022).
- [186] Biosynth Carbosynth. *Sodium pyruvate / 113-24-6 / Biosynth Carbosynth*. 2022. URL: [carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/\(w-productdisplay\)/507066C8FA73DED6802570A8002D88B6](https://carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/(w-productdisplay)/507066C8FA73DED6802570A8002D88B6) (besucht am 17.03.2022).
- [187] Dominik Surek und Silke Stempin. „Stationäre Umströmung von Körpern und Profilen“. In: *Technische Strömungsmechanik*. Hrsg. von Dominik Surek und Silke Stempin. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, 2017, S. 397–425. ISBN: 978-3-658-18756-9. DOI: 10.1007/978-3-658-18757-6{\textunderscore}9.
- [188] Marco S. Reis und Pedro M. Saraiva. „Integration of data uncertainty in linear regression and process optimization“. *AIChE Journal* 51.11 (2005), S. 3007–3019. ISSN: 00011541. DOI: 10.1002/aic.10540.
- [189] A. Cornish-Bowden. „Detection of errors of interpretation in experiments in enzyme kinetics“. *Methods (San Diego, Calif.)* 24.2 (2001), S. 181–190. ISSN: 1046-2023. DOI: 10.1006/meth.2001.1179.
- [190] Bengt Fornberg. „Generation of finite difference formulas on arbitrarily spaced grids“. *Mathematics of computation* 51.184 (1988), S. 699. ISSN: 0025-5718. DOI: 10.1090/S0025-5718-1988-0935077-0.

- [191] Erwin Müller-Erlwein, Hrsg. *Chemische Reaktionstechnik*. 2., überarb. und erw. Aufl. Chemie in der Praxis. Wiesbaden: Teubner, 2007. ISBN: 978-3-8351-0187-6. DOI: 10.1007/978-3-8351-9097-9.
- [192] David Freedman und Persi Diaconis. „On the histogram as a density estimator:L 2 theory“. *Zeitschrift fr Wahrscheinlichkeitstheorie und Verwandte Gebiete* 57.4 (1981), S. 453–476. ISSN: 0044-3719. DOI: 10.1007/BF01025868.
- [193] Matthias Kraume. *Mischen und Rühren: Grundlagen und moderne Verfahren*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. ISBN: 9783527307098. DOI: 10.1002/3527603360.
- [194] Getachew S. Molla, Alexander Himmelspach, Roland Wohlgemuth, Erhard T.K. Haupt und Andreas Liese. „Mechanistic and kinetics elucidation of Mg²⁺/ATP molar ratio effect on glycerol kinase“. *Molecular Catalysis* 445 (2018), S. 36–42. ISSN: 24688231. DOI: 10.1016/j.mcat.2017.11.006.
- [195] Thomas Glonek. „³¹P NMR of Mg-ATP in dilute solutions: Complexation and exchange“. *The International journal of biochemistry* 24.10 (1992), S. 1533–1559. ISSN: 0020-711X. DOI: 10.1016/0020-711X(92)90171-V. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020711X9290171V>.
- [196] Getachew S. Molla, Birhanu M. Kinfu, Jennifer Chow, Wolfgang Streit, Roland Wohlgemuth und Andreas Liese. „Bioreaction Engineering Leading to Efficient Synthesis of L-Glyceraldehyd-3-Phosphate“. *Biotechnology journal* 12.3 (2017), S. 1600625. ISSN: 1860-6768. DOI: 10.1002/biot.201600625.
- [197] DIN Deutsches Institut für Normung e. V. *Grundlagen der Meßtechnik: Teil 3: Auswertung von Messungen einer einzelnen Meßgröße*. 1996-05-00. URL: <https://www.perinorm.com/> (besucht am 22.10.2021).